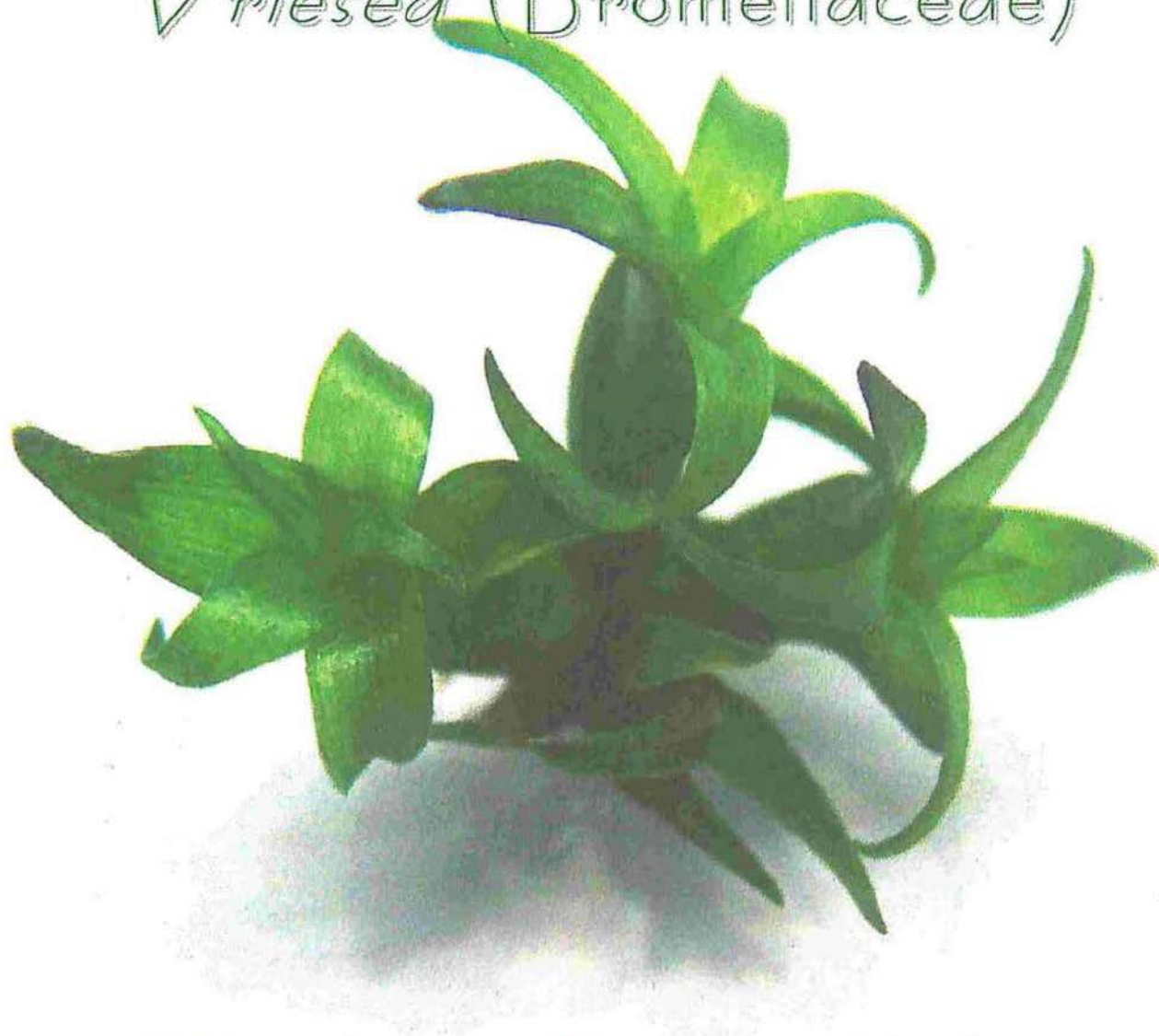


Micropropagação *in vitro*
a partir de sementes de
espécies do gênero
Vriesea (Bromeliaceae)



Silvia Nair Cordeiro Richter

Porto Alegre, Março de 2003.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética



Micropropagação *in vitro* a
partir de sementes de espécies do
gênero *Vriesea* (Bromeliaceae)

Silvia Nair Cordeiro Richter

Orientadora:

Eliane Kaltchuk dos Santos

Co-orientadora:

Maria Helena Bodanese Zanettini

Trabalho de conclusão
apresentado para obtenção
do título de Bacharel na área
Molecular, Celular e Funcional
do Curso de Ciências Biológicas

Porto Alegre, Março de 2003

"O novo homem se importará em aumentar as alegrias e os prazeres da vida, com mais flores, mais beleza, mais humanidade e mais compaixão. E nós temos o dever de fazer deste planeta um paraíso, pois nós não herdamos a Terra dos nossos pais, ela nos foi emprestada pelos nossos filhos"

Autor desconhecido

A minha mãe

e

Aos meus filhos

Agradecimentos

Eliane, obrigada por tudo, pela orientação, amizade e ajuda espiritual.

Maria Helena, muito obrigada por me apoiar com tua ajuda e amizade.

Clarisse, obrigada pela grande ajuda na preparação deste trabalho.

Ana Paula, obrigada pelas valiosas sugestões e correções.

Helga, muito obrigada pela grande amizade e ensinamentos.

Aos amigos Alessandra, Ana Paula, Clarisse, Eliane, Elmo, Janaína, Juliana, Letícia, Luciana, Milena, Mozart, Raquel, Ricardo, Tatiana e muitos outros, porque a lista é grande, gostaria que vocês soubessem o quanto deixam minha vida mais feliz.

A Fundação Zoobotânica pelo fornecimento do material analisado.

Índice

| | |
|--|----|
| Introdução..... | 5 |
| Aspectos Botânicos | 8 |
| O Gênero <i>Vriesea</i> | 11 |
| Conservação e Multiplicação de Germoplasma <i>in vitro</i> | 12 |
| Objetivos | 15 |
| Objetivos gerais..... | 15 |
| Objetivos específicos | 15 |
| Material e Métodos | 16 |
| Resultados..... | 21 |
| Discussão e Conclusões | 29 |
| Referências Bibliográficas | 34 |

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é a maior família de plantas tipicamente Americana, provavelmente originária do topo dos Andes. Ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Patagônia, com 60 gêneros e um número que alcança 3000 espécies conhecidas, sendo que quase 50% destas encontra-se no Brasil.

Esta família possui uma única espécie descrita fora do continente Americano, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre no Oeste da África (Bernardello *et al.*, 1991; Leme, 1984). Leme e Marigo (1993) acreditam que a origem e dispersão das primeiras espécies deva ter ocorrido por volta de 200 milhões de anos atrás, época próxima à separação da Gondwana.

Os principais centros de origem e dispersão estão localizados na América do Sul, sendo eles: Andes e Antilhas, Planalto das Guianas, leste e sul do Brasil, onde se pode encontrar 700 espécies, todas endêmicas (Rauh, 1990).

A família Bromeliaceae é composta por espécies neotropicais que sofreram uma extensa radiação adaptativa, ocupando ambientes extremos e com hábitos que variam de terrestres a epífitas (Ranker *et al.*, 1990). Podem ser encontradas desde o nível do mar a altitudes superiores a 3000 metros, em regiões úmidas e desérticas, como observado por Rundel e Dillon (1998) no deserto de Atacama, em locais com muita ou pouca luminosidade, apresentando dessa forma adaptabilidade a uma gama

enorme de ambientes.

Há muito tempo, as plantas pertencentes à família das bromélias são utilizadas pelos povos nativos das Américas, estando fortemente presentes em suas culturas. Além de serem amplamente empregadas como ornamentais, estas plantas possuem inúmeras outras finalidades. Atualmente, mais de 90 espécies são utilizadas no mundo todo para produção de fibras, forragem, alimentação humana, em rituais místicos e outros. Algumas possuem propriedades medicinais, como, por exemplo, *Bromelia antiacantha* ("bananinha-do-mato"), usada no fabrico de xaropes.

Existem cerca de 25 espécies usadas na alimentação humana, incluindo o bastante conhecido, abacaxi (*Ananas comosus*), cuja produção chega a 9.791.000 ton/ano (dado de 1995, Internet). Como forrageiras, 21 espécies são utilizadas, entre elas a espécie *Vriesea friburgensis*, consumida pelo gado da região sudeste do estado do RS.

As bromélias vêm sendo intensamente utilizadas como plantas ornamentais sendo apreciadas no mundo todo, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Japão, onde seu cultivo movimenta uma economia considerável (Paula e Silva, 2000).

No Brasil, a utilização de bromélias em jardins teve sua explosão desde que o famoso paisagista Burle Marx começou a utilizá-las com freqüência em seus projetos. Atualmente, há uma crescente tendência de

utilização dessas plantas, tanto em jardins quanto em interiores, o que demanda um aumento na sua produção, a fim de minimizar a coleta de indivíduos de populações naturais.

A coleta predatória de bromélias da natureza, bem como a perda de habitats devido à ação antrópica, contribuem para o aumento da taxa de plantas vulneráveis, ameaçadas de extinção ou mesmo em extinção (IUCN, 1998).

A bibliografia científica sobre as diferentes espécies de bromélias é consideravelmente restrita. Informações sobre o impacto do modo de reprodução na estrutura genética, o isolamento de populações e especiação são escassas. Mesmo aspectos básicos, como número cromossômico, são desconhecidos para muitas dessas espécies.

ASPECTOS BOTÂNICOS

As bromélias são monocotiledôneas pertencentes à família Bromeliaceae; Reino Plantae; Sub-reino Trachaeophyta; Divisão Magnoliophyta; Classe Liliopsida; Sub-classe Zingiberidae e à Ordem Bromeliales (Leme e Marigo, 1993).

A família Bromeliaceae está dividida em três sub-famílias (Smith e Downs 1974, 1977, 1979; Leme e Marigo, 1993):

- Pitcairnoideae Harms - com 16 gêneros (~890 espécies) agrupados em três tribos: Pitcairniaeae, Brocchineae e Puyaea;
- Bromelioideae Reichenbach - a mais diversificada das três sub-famílias, com 29 gêneros, mas com o menor número de espécies (~650 espécies);
- Tillandsioideae Harms - com nove gêneros, porém com o maior número de espécies (~1000 espécies).

Quanto ao seu hábito, as bromélias podem ser epífitas ou terrestres. As epífitas, como as do gênero *Vriesea*, vivem sobre árvores ou troncos caídos. Estas plantas nutrem-se do líquido e detritos orgânicos que se depositam nos reservatórios d'água formados com suas rosetas, também conhecidos como "tanques". Em *Vriesea gigantea*, por exemplo, o tanque chega a conter 4 litros de água. A solução é absorvida pelas escamas na base da face interna das folhas (figura 1).

As espécies de hábito terrestre, as quais crescem no solo ou sobre pedras e cuja nutrição se dá pela raiz, possuem, na maioria, folhas armadas de espinhos afiados e margens serradas como nos gêneros *Encholirium* e *Dyckia*.

Dentre as inúmeras espécies de bromélias descritas, aproximadamente 76 ocorrem no Rio Grande do Sul, com representantes das três sub-famílias (tabela 1).

Tabela 1: Gêneros de Bromeliaceae que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul

| Sub-família | Nº gêneros Descritos | Gêneros no RS | Nº espécies no RS |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Pitcarnioideae | 16 | <i>Dyckia</i> | 15 |
| Bromelioideae | 31 | <i>Aechmea</i> | 11 |
| | | <i>Ananas</i> | 2 |
| | | <i>Billbergia</i> | 3 |
| | | <i>Bromelia</i> | 2 |
| | | <i>Edmundoa</i> | 1 |
| | | <i>Nidularium</i> | 4 |
| | | <i>Wittrockia</i> | 1 |
| Tillandsioideae | 9 | <i>Tillandsia</i> | 17 |
| | | <i>Vriesea</i> | 20 |

Fonte: Buckup (2000)

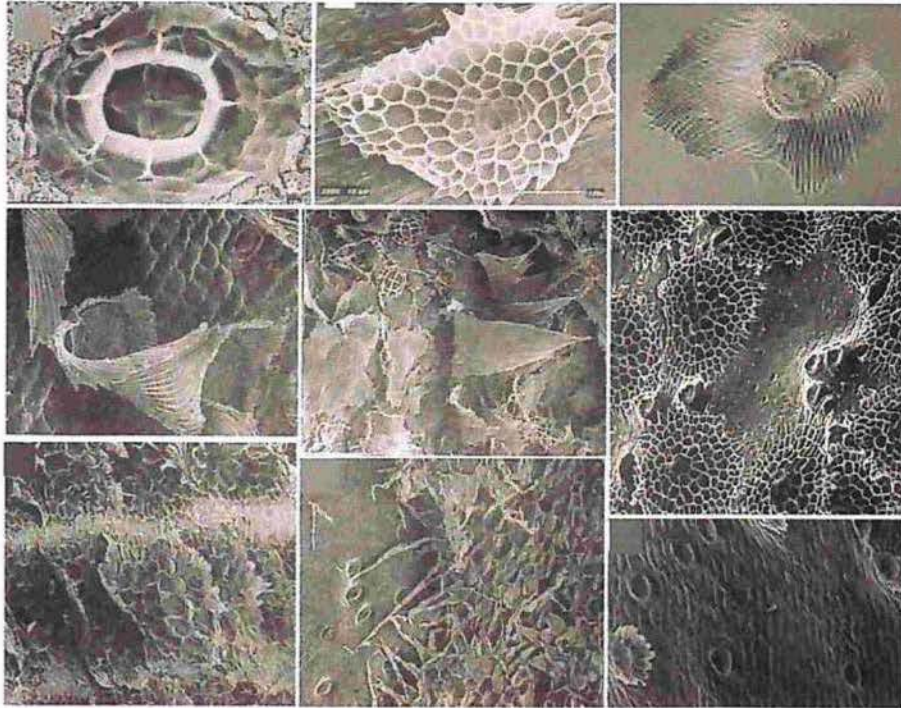


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares mostrando as escamas de absorção de alguns gêneros de Bromeliaceae. Extraído e modificado de Benzing (2000).

O GÊNERO *VRIESEA*

O gênero *Vriesea*, cujo nome é uma homenagem ao professor holandês H. de Vries (1807-1862), conta com somente um sub-gênero, *Vriesea*, o qual é subdividido em duas seções: *Xiphion* (E. Morren) e *Vriesea*. Esse gênero é o terceiro maior da família em número de espécies descritas (~250 sp.), ficando atrás somente dos gêneros *Pitcairnia* (~295sp.-Pitcairnoideae) e *Tillandsia* (~550sp.-Tillandsioideae).

Para o estado do Rio Grande do Sul são citadas 20 espécies (tabela 1), que ocorrem principalmente nas regiões de Mata Atlântica, no Litoral norte do Estado (Reitz,1983; Winkler,1980 e 1982; Waechter,1992).

O gênero *Vriesea* é característico por apresentar as bordas das folhas lisas, sem espinhos e a inflorescência externa ligada a uma haste que pode ser curta ou longa, com até cerca de um metro. Os frutos são cápsulas tricarpelares, geralmente com grande quantidade de sementes, sendo estas pequenas e com apêndices plumosos.

Muitas das espécies de *Vriesea* ocorrentes em nosso Estado apresentam grande potencial ornamental, estando algumas delas na lista de espécies vulneráveis e em perigo de extinção: *Vriesea corcovadensis* Mez, *V. guttata* E. Morren, *V. platzmanii* E. Morren, *V. psittacina* Lindl. e *V. scalaris* E. Morren (Baptista e Longhi-Wagner, 1998).

CONSERVAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

A perda da diversidade biológica tem sido um problema preocupante em todo o mundo. A destruição de florestas tropicais, por exemplo, tem levado muitas espécies animais e vegetais à extinção. Este é o caso das bromélias, que com a devastação da Floresta Atlântica, aliada à coleta predatória e ao endemismo de muitas espécies, têm feito crescer a cada dia o rol daquelas ameaçadas de extinção.

As bromélias têm se tornado populares, sendo encontradas com facilidade no comércio. Contudo, muitas destas plantas são obtidas por coleta ilegal e indiscriminada nas matas. Há, portanto, um forte apelo econômico e ecológico para que seja desenvolvida uma metodologia eficiente para a multiplicação de espécies desta família.

Os métodos naturais de propagação, sejam por via sexuada ou assexuada, são incapazes de produzir um grande número de plantas, em um curto espaço de tempo, como requisitado para fins comerciais ou mesmo para recuperar áreas impactadas (Mercier e Kerbauy, 1995; Carneiro *et al.*, 1999).

Neste sentido, a biotecnologia pode ser vista como uma estratégia a ser empregada na conservação dos recursos genéticos vegetais, uma vez que permite a proteção, e simultaneamente, a utilização de espécies de interesse econômico. Plantas produzidas por processos biotecnológicos, como a cultura de tecidos, podem ser utilizadas

como fonte alternativa de estoques e assim aliviar a pressão sobre populações naturais ou mesmo permitir a reintrodução de exemplares nos respectivos habitats.

Em bromélias a manutenção de bancos de germoplasma a campo é dificultada em função da propagação vegetativa ser bastante lenta, devido ao baixo número de brotos laterais produzidos pelas plantas após o florescimento. O uso de sementes também não supre as necessidades, pois as taxas de germinação podem ser baixas, além do estágio juvenil da planta ser bastante longo.

Já o uso da cultura de tecidos apresenta inúmeras vantagens interessantes, pois além de permitir taxas de multiplicação mais altas em menor tempo, ainda gera mudas mais uniformes, de alta qualidade e livres de doenças.

Apesar da cultura *in vitro* constituir uma valiosa ferramenta para a multiplicação e conservação, as bromeliáceas parecem ser bastante recalcitrantes à cultura, havendo necessidade de grandes adaptações na técnica, para permitir sua micropropagação. Especificamente na subfamília Tillandsioideae, as dificuldades estão relacionadas à iniciação da cultura e ao crescimento lento (Mekers, 1977).

Uma das maneiras interessantes de micropropagar bromélias é mediante o uso de sementes como explante. Fischer e Zimmer (1988)

afirmam que as sementes germinadas *in vitro* num meio com fitorreguladores são capazes de desenvolver além da plântula resultante da fertilização, brotos adicionais, sendo estes, clones da plântula produzida sexualmente. Neste caso, o conjunto das plantas obtidas ao final do processo terá seu parentesco, genótipo e fenótipo desconhecidos. Por outro lado, tal metodologia de micropropagação permite a manutenção da variabilidade genética da população original (Mercier e Kerbauy, 1997).

Apesar da importância econômica das espécies desta família e de seu pobre estado de conservação, o número de publicações sobre a conservação *in vitro* de bromélias ainda é bastante restrito, inclusive no Brasil, justificando o esforço em estabelecer condições de cultura ideais para a multiplicação em larga escala de um maior número de espécies.

OBJETIVOS

Este estudo faz parte de um projeto mais amplo onde serão investigados aspectos relativos à filogenia, variabilidade genética, citogenética e cultura de tecidos da família Bromeliaceae. Estas informações serão fundamentais para a utilização e conservação destes recursos genéticos disponíveis na natureza. Para as análises genéticas, foi escolhido o gênero *Vriesea* pertencente à sub-família Tillandsioideae. Tal escolha foi baseada na larga ocorrência deste gênero no Rio Grande do Sul e no valor ornamental potencial de suas espécies.

OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por objetivo o estabelecimento de um protocolo viável e eficaz à multiplicação *in vitro* de espécies do gênero *Vriesea*, visando contribuir para a conservação *ex situ* destas espécies.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- testar diferentes meios de cultura quanto à composição de reguladores de crescimento;
- avaliar a eficiência do meio semi-sólido X meio semi-sólido com reforço de meio líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de *Vriesea*: *V. procera* (planta nº009) e *V. scalaris* (planta nº 134 e 535) (figuras 2a-b). A planta de *V. procera* proveio da coleção de bromélias do Departamento de Genética (UFRGS) e as duas plantas de *V. scalaris* provieram do bromeliário da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

Da planta 009 de *V. procera*, foram utilizadas para a cultura seis cápsulas maduras e das plantas 134 e 535 de *V. scalaris*, foram utilizadas três cápsulas por planta (figura 3). As cápsulas, ainda bem fechadas, foram lavadas com água e sabão, depois enxaguadas com água destilada. Antes de abrir cada cápsula, esta era colocada em álcool 96°C e em seguida flambada, por duas vezes, tendo o cuidado de não aquecer em demasia. Os lóculos foram separados com o auxílio de um bisturi, sendo cada um deles cortado transversalmente. Desta forma, foi possível descartar o maior número de apêndices plumosos. As hastes restantes eram excisadas com o auxílio de uma tesourinha (figura 3). Assim, as sementes, sem os apêndices plumosos, foram inoculadas em placas de Petri (10 cmØ) contendo meio de cultura semi-sólido.

O meio de indução era composto por sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de B5 (Gamborg, 1968), 3% de sacarose e 0.25% de Phytigel. Foram inoculadas 13 placas de *V. procera*, tendo em média 86 sementes por placa. Para cada planta de *V. scalaris*, foram

inoculadas 12 placas, tendo em média 100 sementes cada. As sementes foram mantidas neste meio por 45 dias, em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz a 25°C (figura 4a).

Após este período, foram obtidas mais de 1000 sementes germinadas por planta. As plântulas foram homoganeamente selecionadas quanto ao tamanho e à forma, sendo inoculadas seis placas (20 plântulas/placa) para cada um dos cinco meios de multiplicação a serem testados (tabela 2 e figura 4b). Três placas de cada tratamento receberam um reforço de 20µl do mesmo meio de cultura, porém na forma líquida, que era gotejado em cima de cada plântula a cada sub-cultivo (figura 4 c-d). Desta maneira, as folhas ficavam em contato direto com o meio.

Os cinco meios básicos testados continham sais de MS, vitaminas de B5 e 3% de sacarose. O meio semi-sólido continha 0,25% de Phytigel. As diferenças entre eles, conforme descrito na tabela 2, referem-se à composição hormonal.

Tabela 2: Meios de cultura testados para multiplicação.

| MEIOS | BAP | ZEATINA | GA ₃ | ANA |
|-------|-------|---------|-----------------|----------|
| A | 1mg/l | - | 0.1mg/l | 0.01mg/l |
| B | 1mg/l | 2mg/l | 0.1mg/l | 0.01mg/l |
| C | 2mg/l | - | 0.1mg/l | 0.01mg/l |
| D | 2mg/l | 1mg/l | 0.1mg/l | 0.01mg/l |
| E | 2mg/l | 1mg/l | - | 0.01mg/l |



Figura 2: Plantas com inflorescências utilizadas no presente trabalho: **a)** *V. procera*; **b)** *V. scalaris*

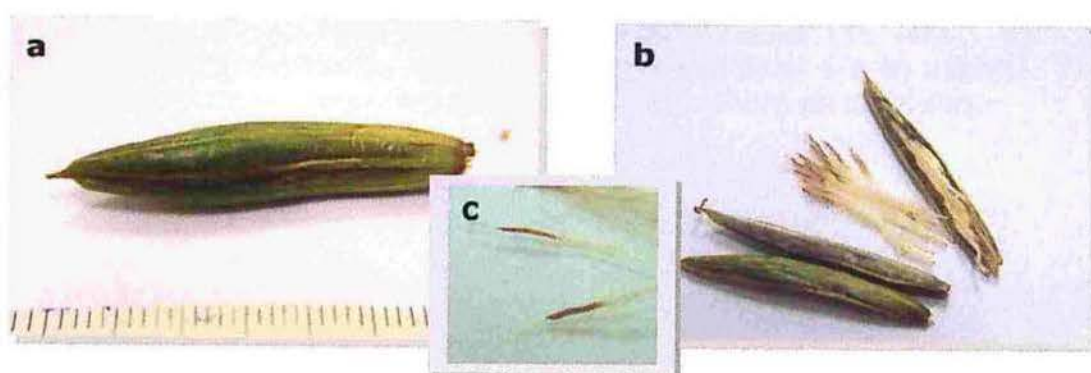


Figura 3: **a)** Cápsula de *Vriesea* fechada (~3,5cm); **b)** Cápsula com um lóculo aberto e sementes inteiras; **c)** Detalhe das sementes (a parte mais escura) com os apêndices plumosos antes de serem cortados.

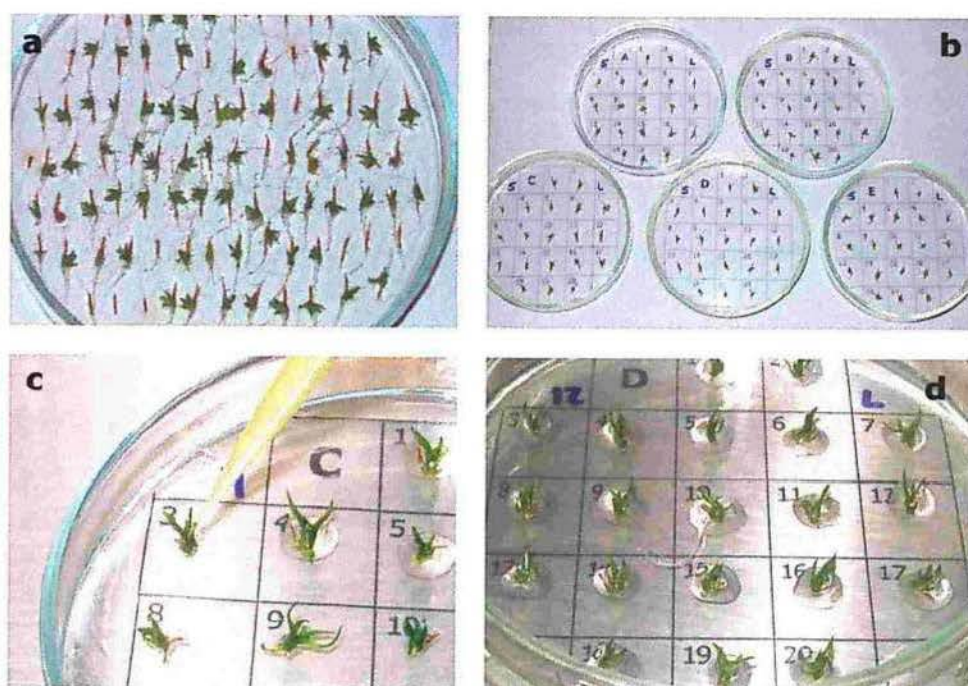


Figura 4: a) Placa com plântulas germinadas (45 dias); b) Explantes inoculados nos cinco diferentes meios; c e d) detalhe mostrando o gotejamento do meio líquido sobre as plântulas.

O potencial de crescimento foi avaliado mediante a pesagem do material e contagem do número de brotos formados. Foi feito um total de quatro pesagens, uma a cada sub-cultivo (45 dias), sendo a contagem do número de brotos induzidos feita apenas no último sub-cultivo.

Para a pesagem das plântulas, foi necessário pesar a placa com o meio novo antes da transferência das plântulas, para, então, pesar novamente, subtraindo o valor da placa vazia. Desta forma, foi obtido o peso líquido, ou seja, o somatório do peso das 20 plântulas. Como a água do meio de cultura evapora rapidamente no fluxo de ar da câmara, esta evaporação teve de ser padronizada, estimando-se uma perda 40mg de água em 1 minuto, tempo suficiente para a transferência de 20 plântulas para a nova placa. Esta diferença foi adicionada ao peso líquido de cada placa.

Para acompanhar o processo de multiplicação individualmente por plântula, foi realizada uma numeração no fundo de cada placa com o auxílio de uma transparência (figura 4c e d).

Para análise estatística foi utilizado o teste de ANOVA com diferenciação de médias pelo teste de SNK ($p < 0.05$). Os valores de peso fresco foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e o número de brotações totais em $\log(x+1)$.

RESULTADOS

As cápsulas da planta 009 de *V. procera* continham, em média, 180 sementes, enquanto as das plantas 134 e 535 de *V. scalaris* tinham em média 480 sementes. Para a obtenção da média do peso seco inicial das sementes, três grupos de 20 sementes por planta, sem os apêndices plumosos, foram pesados, separadamente. Foi obtida uma média de peso de 7,0mg/20 sementes para *V. procera* e uma média de 6,0mg/20 sementes para as plantas 134 e 535 de *V. scalaris*. Portanto, *V. scalaris* possui sementes menores e em maior número do que *V. procera*. Este valor do peso seco das sementes foi subtraído na primeira pesagem das plântulas, aos 45 dias.

Os primeiros primórdios foliares começaram a surgir entre três e quatro dias após a inoculação no meio de indução, sendo que entre 30 e 40 dias todas as sementes viáveis já haviam germinado. Aos 45 dias de cultura, as plântulas que germinaram e que apresentavam aspecto normal e tamanho padronizado, foram inoculadas nos cinco diferentes meios de multiplicação (tabela 2 e figura 4a-b).

A avaliação da eficiência dos diferentes tratamentos empregados, levou em conta a formação de brotos laterais e o incremento de peso, referente ao ganho de massa que os explantes conseguem acumular durante o cultivo. As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos para *V. procera* e *V. scalaris*, respectivamente, quanto ao

potencial de multiplicação sob diferentes tratamentos. Os dados indicam que *V. scalaris* possui uma maior capacidade de proliferação do que *V. procera*. Por outro lado, *V. procera* tem um maior aumento de peso do que *V. scalaris*, tendo, portanto, plantas de maior tamanho.

Tabela 3: Avaliação do potencial de multiplicação de *V. procera* sob diferentes tratamentos.

| MEIO | REFORÇO | N | MÉDIA DE BROTOS/PLACA (DESVIO PADRÃO) | MÉDIA de PESO (mg)/PLACA (DESVIO PADRÃO) | Nº DE BROTOS/EXPLANTE | BROTOS /g |
|--------------|---------|-----------|---------------------------------------|--|-----------------------|--------------|
| A | SEM | 3 | 28,33 (6,5) | 1030,4 (213,6) | 1,41 | 27,50 |
| B | | 3 | 25,33 (8,3) | 671,1 (50,9) | 1,26 | 37,75 |
| C | | 3 | 48,00 (47,6) | 1142,8 (699,0) | 2,40 | 42,01 |
| D | REFORÇO | 3 | 23,00 (4,3) | 693,2 (81,1) | 1,15 | 33,19 |
| E | | 3 | 37,00 (16,0) | 942,7 (317,6) | 1,85 | 39,25 |
| Total | | 15 | 32,33 (21,6) | 896,0 (359,3) | 1,61 | 36,08 |
| A | COM | 3 | 21,00 (1,0) | 853,5 (27,9) | 1,05 | 24,61 |
| B | | 3 | 20,33 (0,5) | 732,9 (99,5) | 1,01 | 27,74 |
| C | | 3 | 22,67 (2,5) | 758,4 (141,5) | 1,13 | 29,89 |
| D | REFORÇO | 3 | 20,00 (0,0) | 737,1 (98,9) | 1,00 | 27,14 |
| E | | 3 | 22,33 (4,0) | 809,6 (251,3) | 1,11 | 27,59 |
| Total | | 15 | 21,27 (2,1) | 778,3 (130,8) | 1,06 | 27,32 |
| TOTAL | | 30 | 26,80 (16,1) | 837,2 (272,3) | 1,33 | 31,70 |

Tabela 4: Avaliação do potencial de multiplicação da *V. scalaris* sob diferentes tratamentos.

| MEIO | REFORÇO | N | MÉDIA DE BROTOS/PLACA (DESVIO PADRÃO) | MÉDIA de PESO (mg)/PLACA (DESVIO PADRÃO) | Nº DE BROTOS/EXPLANTE | BROTOS /g |
|--------------|---------|-----------|---------------------------------------|--|-----------------------|--------------|
| A | SEM | 6 | 56.33 (42.9) | 818.7 (533.1) | 2.81 | 68.81 |
| B | | 6 | 29.50 (17.6) | 450.2 (162.8) | 1.47 | 65.53 |
| C | | 6 | 49.33 (25.2) | 658.3 (215.4) | 2.46 | 75.95 |
| D | REFORÇO | 6 | 54.50 (24.1) | 651.7 (172.5) | 2.72 | 83.65 |
| E | | 6 | 48.17 (28.9) | 571.9 (219.4) | 2.40 | 84.28 |
| Total | | 30 | 47.57 (28.6) | 630.1 (300.0) | 2.37 | 75.50 |
| A | COM | 6 | 44.17 (14.2) | 649.8 (118.1) | 2.21 | 67.98 |
| B | | 6 | 71.00 (57.3) | 864.9 (522.8) | 3.55 | 82.09 |
| C | | 6 | 76.83 (48.4) | 885.9 (440.8) | 3.84 | 86.73 |
| D | REFORÇO | 6 | 71.33 (40.8) | 850.1 (444.7) | 3.56 | 83.91 |
| E | | 6 | 72.50 (30.2) | 789.8 (236.5) | 3.62 | 91.79 |
| Total | | 30 | 67.17 (39.9) | 808.1 (366.5) | 3.35 | 83.12 |
| TOTAL | | 60 | 57.37 (35.8) | 719.1 (344.0) | 2.86 | 79.31 |

Em teoria, o explante usa suas reservas para crescer em tamanho e conseqüentemente em massa. A taxa de crescimento é reduzida quando há indução de multiplicação, uma vez que as reservas são empregadas para o desenvolvimento de novos brotos. Sendo assim, quanto mais o explante cresce menos brotações origina (Pompelli, 2002).

Esse efeito foi percebido com clareza entre as duas espécies por nós estudadas (tabelas 3 e 4; figuras 5 e 6). Em *V. procera* houve uma média de incremento de peso maior que em *V. scalaris*, 0,837g/placa e 0,719g/placa respectivamente. Contudo, *V. scalaris* teve um número de brotações superior, com a média de 57,3 brotos/placa enquanto que em *V. procera* esta média alcançou apenas 26,8 brotos/placa.

Os dados referentes ao número de brotos/g também evidenciam o efeito de incremento de peso X multiplicação. Em *V. procera* foram obtidos 31,70 brotos/g e em *V. scalaris*, 79,31 brotos/g, sendo tais diferenças significativas (tabelas 3, 4 e 5). Foi verificada ainda, uma interação entre a espécie e o uso de reforço de meio líquido. Para *V. procera* o uso de reforço não resultou em um incremento significativo no número de brotos/g, enquanto em *V. scalaris* este número foi significativamente maior (tabelas 6 e 7).

Para as duas plantas de *V. scalaris*, não foram observadas diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros investigados, desta maneira, os dados a serem apresentados encontram-se agrupados.

Tabela 5: Análise de Variância referentes aos dados de brotos/g em *V. scalaris* e *V. procera* obtidos *in vitro*.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | QM para o n° de brotos/g (transformação log ₁₀) | | Significância |
|--------------------|----|--|--------------|---------------|
| | | QM | Sig. | |
| ESPÉCIES | 1 | 2,929 | 0.000 | |
| REFORÇO | 1 | 0.0170 | 0.248 | |
| ESPÉCIES X REFORÇO | 1 | 0.08159 | 0.002 | |
| Erro | 86 | 0.007918 | | |

Os cinco meios de multiplicação testados não diferiram significativamente quanto aos seus efeitos em nenhuma das duas espécies (tabelas 6 e 7). No entanto, pode ser observado que o meio "C", com 2mg/l BAP + 0.1mg/l GA₃ + 0.01mg/l ANA teve uma leve tendência de melhora para *V. procera*, tanto com meio líquido como sem ele (tabela 3).

Também para *V. scalaris*, o meio "C" (com reforço) resultou nas melhores taxas de multiplicação: 86,73 brotos/grama e 3,84 brotos/explante (tabela 4).

Tabela 6: Análise de Variância referente aos dados de peso e número de brotos formados a partir de sementes de uma planta de *Vriesea procera* obtidos *in vitro*

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | QM para o n° de brotos/placa (transformação raiz quadrada) | | QM para o peso/placa (transformação log ₁₀) | |
|--------------------|----|---|---------|--|---------|
| | | QM | Sig. | QM | Sig. |
| | | MEIO | 4 | 0,971 | (0,603) |
| REFORÇO | 1 | 5,852 | (0,054) | 0,01295 | (0,325) |
| MEIO X REFORÇO | 4 | 0,466 | (0,852) | 0,00776 | (0,659) |
| Erro | 20 | 1,395 | | 0,01270 | |

Tabela 7: Análise de Variância referente aos dados de peso e número de brotos formados a partir de sementes de duas plantas de *Vriesea scalaris* obtidos *in vitro*.

| CAUSA DE VARIAÇÃO | GL | QM para o n° de brotos/placa | | QM para o peso/placa | |
|-------------------------|----|-------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| | | (transformação raiz quadrada) | | (transformação log ₁₀) | |
| | | QM | Sig. | QM | Sig. |
| MEIO | 4 | 3,070 | (0.582) | 0,01697 | (0.664) |
| REFORÇO | 1 | 23,189 | (0.025) | 0.17200 | (0.018) |
| PLANTA | 1 | 10,377 | (0.126) | 0,05238 | (0.181) |
| MEIO X REFORÇO | 4 | 3,905 | (0.462) | 0,03182 | (0.358) |
| MEIO X PLANTA | 4 | 3,927 | (0.459) | 0,03355 | (0.331) |
| REFORÇO X PLANTA | 1 | 12,710 | (0.091) | 0,04215 | (0.229) |
| MEIO X REFORÇO X PLANTA | 4 | 7,439 | (0.158) | 0,05815 | (0.105) |
| Erro | 40 | 4,248 | | 0,02825 | |

Quanto ao uso de reforço de meio líquido, não foi verificado para *V. procera* diferença significativa entre os meios (tabela 6). Em *V. scalaris*, o tratamento com reforço de meio líquido levou a uma resposta significativamente superior na multiplicação de brotos (tabela 7). Sem o reforço foram produzidos 75,50 brotos/g e com o reforço a produção foi de 83,12 brotos/g (tabela 4 e gráfico 3).

Tabela 7: Análise de Variância referente aos dados de peso e número de brotos formados a partir de sementes de duas plantas de *Vriesea scalaris* obtidos *in vitro*.

| CAUSA DE VARIAÇÃO | GL | QM para o nº de brotos/placa (transformação raiz quadrada) | | QM para o peso/placa (transformação log ₁₀) | |
|-------------------------|----|---|----------------|--|----------------|
| | | QM | Sig. | QM | Sig. |
| MEIO | 4 | 3,070 | (0.582) | 0,01697 | (0.664) |
| REFORÇO | 1 | 23,189 | (0.025) | 0.17200 | (0.018) |
| PLANTA | 1 | 10,377 | (0.126) | 0,05238 | (0.181) |
| MEIO X REFORÇO | 4 | 3,905 | (0.462) | 0,03182 | (0.358) |
| MEIO X PLANTA | 4 | 3,927 | (0.459) | 0,03355 | (0.331) |
| REFORÇO X PLANTA | 1 | 12,710 | (0.091) | 0,04215 | (0.229) |
| MEIO X REFORÇO X PLANTA | 4 | 7,439 | (0.158) | 0,05815 | (0.105) |
| Erro | 40 | 4,248 | | 0,02825 | |

Quanto ao uso de reforço de meio líquido, não foi verificado para *V. procera* diferença significativa entre os meios (tabela 6). Em *V. scalaris*, o tratamento com reforço de meio líquido levou a uma resposta significativamente superior na multiplicação de brotos (tabela 7). Sem o reforço foram produzidos 75,50 brotos/g e com o reforço a produção foi de 83,12 brotos/g (tabela 4 e gráfico 3).

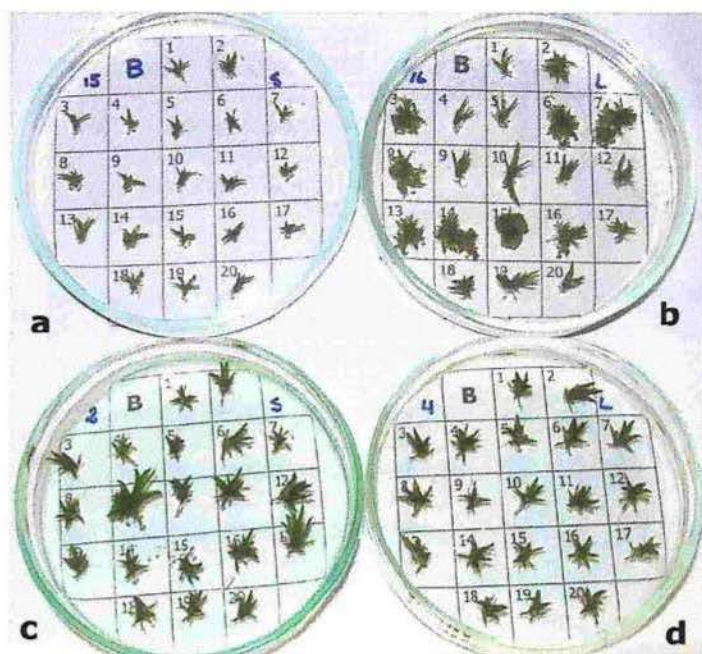


Figura 5: Explantes em meio de multiplicação **B:** **a)** *V. scalaris* em meio sem reforço; **b)** *V. scalaris* com reforço de meio líquido; **c)** *V. procera* em meio sem reforço; **d)** *V. procera* com reforço de meio líquido.

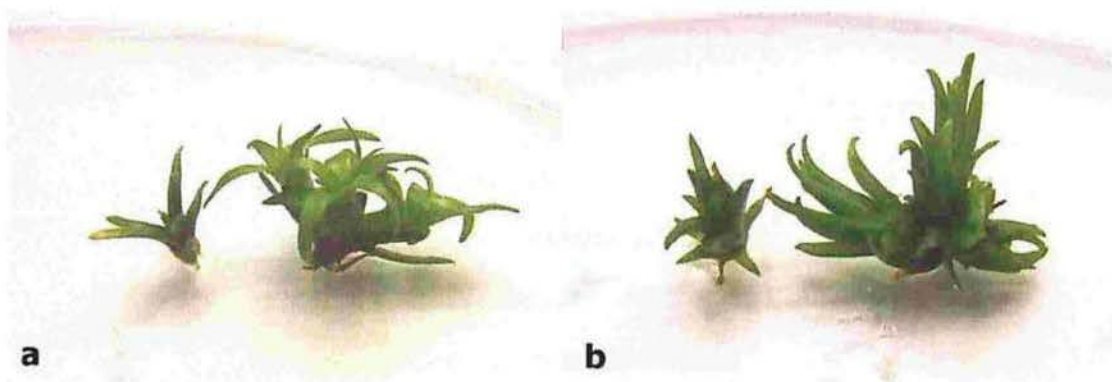


Figura 6: Detalhe de explantes com e sem brotações:
a) *V. scalaris*; **b)** *V. procera*

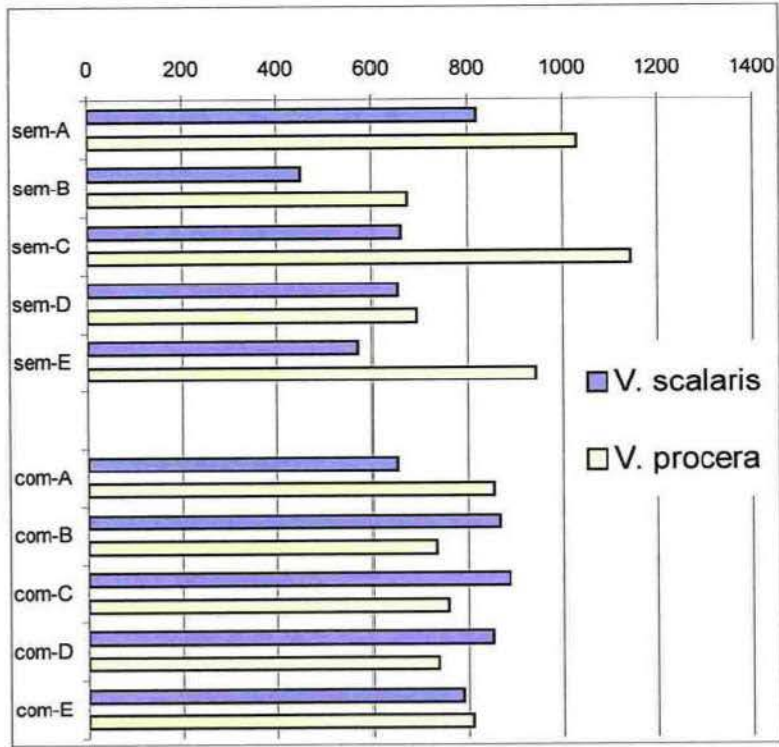


Gráfico 1: Média de peso (mg) de brotos por placa

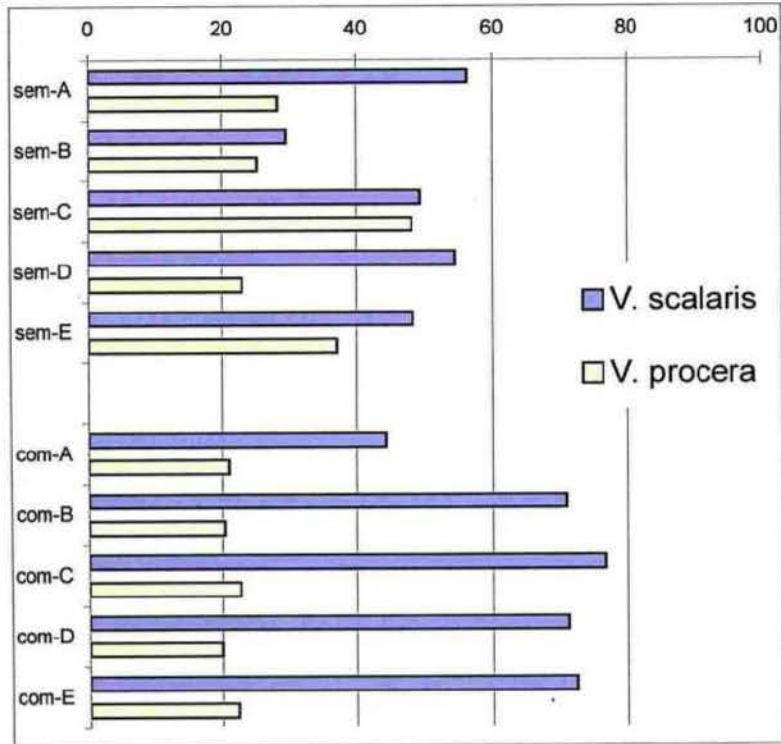


Gráfico 2: Média de brotos por placa, onde 20 é o número inicial de explantes

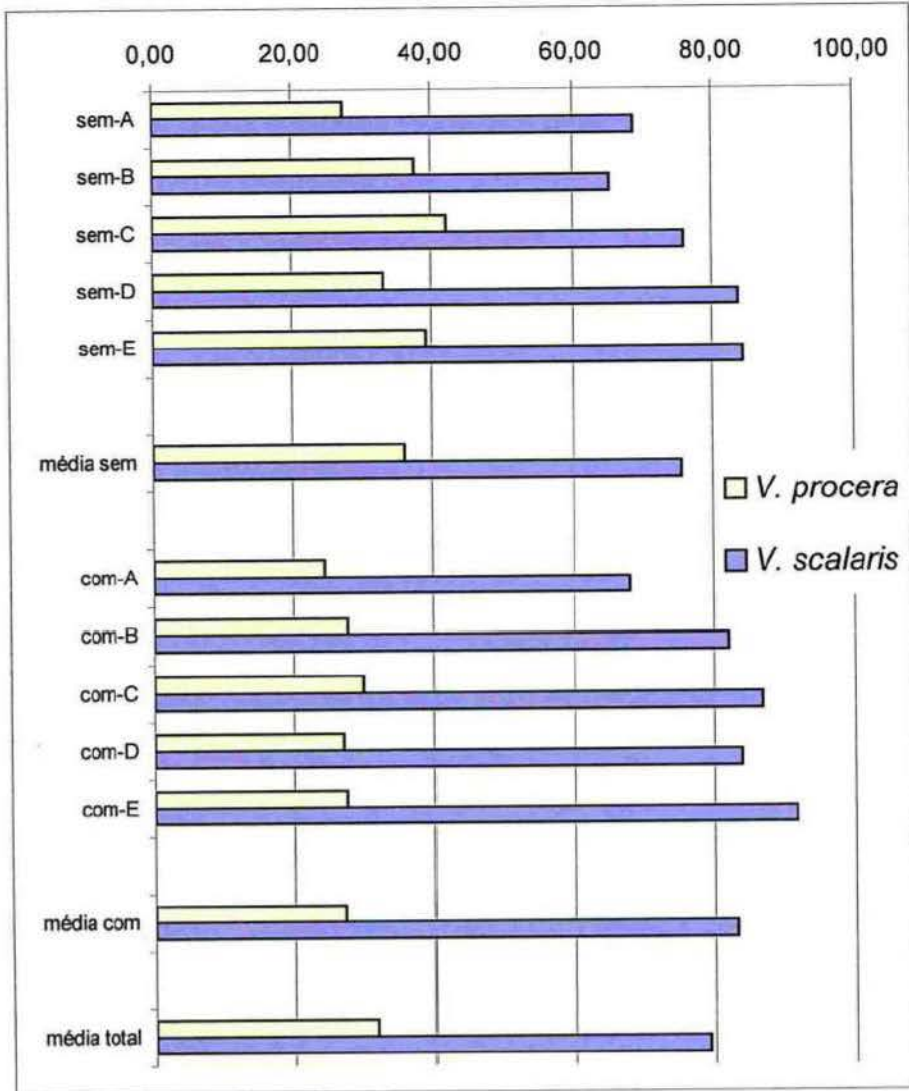


Gráfico 3: Médias de brotos por grama nas espécies *V. procera* e *V. scalaris*

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O desenvolvimento de um protocolo eficiente de cultura *in vitro* em bromélias, é com certeza, de interesse tanto para fins comerciais como para a conservação de recursos genéticos. Contudo, as informações relativas à propagação *in vitro* de plantas da subfamília Tillandsioideae é ainda restrita, provavelmente devido à dificuldade de iniciação da cultura, às diferentes condições de cultura requeridas e ao crescimento lento (Mekers, 1977).

Trabalhos de micropropagação de bromélias realizados no Brasil (Mercier e Kerbauy, 1992; 1993; 1994 e 1997) descrevem o uso de diferentes meios de iniciação da cultura, partindo de sementes maduras: meio KC (Knudson, 1946), meio MS (Murashige e Skoog, 1962) e MS/2. Tem sido verificado que o crescimento das bromélias é favorecido por altos níveis de fosfato no meio de cultura (Mercier e Kerbauy, 1992), o que faz do meio KC um dos mais recomendados. Entretanto, Pompelli (2002) relata que seu grupo emprega os meios MS e MS/2 na micropropagação de bromélias.

No presente trabalho, optamos pelo uso do meio básico já descrito no item Material e Métodos, contendo sais do MS e vitaminas do B5. Tal escolha deve-se aos bons resultados já alcançados com o uso rotineiro do mesmo em nosso laboratório.

Mekers (1977) investigou as necessidades nutricionais e

fisiológicas de certos gêneros da subfamília Tillandsioideae, tendo para isso, utilizado sementes de *Guzmania*, *Tillandsia* e *Vriesea*. Este autor verificou que havia necessidade de adicionar reguladores de crescimento às etapas de iniciação e de proliferação, tais como ANA e GA₃. O uso dos fitorreguladores BAP e ANA no meio de multiplicação de bromélias é referido por diversos autores (Vacín e Went, 1949; Hosoki e Asahira, 1980; Mercier e Kerbauy, 1992, 1993 e Pompelli, 2002).

Todos os meios de multiplicação testados neste trabalho (ver suas composições no item Material e Métodos) incluíram BAP e ANA. Em quatro destes meios foi também adicionado GA₃. Uma variante nova foi a inclusão de Zeatina ao meio de multiplicação. Há evidências de que o uso combinado de BAP e Zeatina resulte num maior número de brotos adventícios e num crescimento mais rápido.

Ao contrário do esperado, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os cinco meios avaliados. O meio C (2mg/l BAP + 0.1mg/l GA₃ + 0.01mg/l ANA), porém, parece ter um efeito ligeiramente superior aos demais. Portanto, o uso de Zeatina no meio de multiplicação não resulta em um incremento que justifique seu emprego, principalmente considerando o elevado custo.

A consistência do meio de cultura é um fator que também deve ser avaliado durante o estabelecimento de protocolos de

multiplicação, uma vez que pode afetar consideravelmente a eficiência de um sistema de micropropagação (Aitken-Crhistie, 1991).

A produção em escala comercial, visando retorno financeiro, exige que os protocolos empregados resultem em taxas elevadas de multiplicação com os menores custos. Desta forma, o uso de agentes gelificantes é visto com restrições pelos produtores considerando seu preço elevado.

Os protocolos de cultivo *in vitro* para propagação massal geralmente empregam meio líquido, não apenas pela redução nos custos, mas também pelos possíveis benefícios. Teisson (1996) argumenta que os explantes têm um maior contato com os nutrientes quando em meio líquido, o que resulta numa maior eficiência. Contudo, é sabido que a imersão dos explantes no meio líquido pode, algumas vezes, levar à asfixia e à vitrificação (Pompelli, 2002).

Para as bromélias, especialmente, a consistência do meio poderá ser determinante para o sucesso na micropropagação, tendo em vista que suas folhas possuem escamas adaptadas para a absorção de água e nutrientes (Strehl, T., 1983) (Figura 1). Segundo Hosoki e Asahira (1980), em *Vriesea poelmanii* e *Aechmea fasciata*, a indução e a formação de brotos adventícios foi melhorada com o uso de meio líquido.

O trabalho realizado por Pompelli (2002) em *Dyckia distackya*, no qual foi avaliado meio líquido X gelificado, mostrou que o meio líquido

foi mais eficiente quando considerado o número de brotos formados por explante. Entretanto, foi verificada a presença de brotos hiperídricos neste meio.

Por outro lado, Mekers (1977) observou que em *Guzmania*, *Tillandsia* e *Vriesea*, o meio semi-sólido foi mais eficiente que o meio líquido na fase de multiplicação. O estudo realizado por Mekers e Van Onsem (1983) também mostrou que no gênero *Vriesea*, a cultura em meio solidificado com ágar produziu um maior número de plantas.

A avaliação da metodologia de gotejamento sobre o explante (com reforço x sem reforço de meio líquido) feita no presente estudo, teve como objetivo buscar um sistema em que a disponibilização de nutrientes seja otimizada, mas com riscos de hiperidricidade ou oxidação minimizados.

Os dados apresentados neste trabalho, relacionados ao uso de reforço líquido, mostram uma evidente superioridade na espécie *V. scalaris*. Contudo, o mesmo não foi observado em *V. procera*, uma vez que as diferenças entre os dois tratamentos não foram significativas. Portanto, apesar das duas espécies pertencerem ao mesmo gênero, as respostas foram diversas. Assim, pode-se concluir pelos resultados até então obtidos, que a resposta na proliferação das espécies de *Vriesea* estudadas são altamente genótipo-dependentes, evidenciando que um

mesmo protocolo não poderá ser aplicado para diferentes espécies deste gênero.

O método de colocar o meio de cultura líquido sobre o explante é, sem dúvida, bem mais laborioso, sendo, portanto, pouco indicado para situações que requerem produção em escala comercial. Uma possibilidade interessante nestes casos, seria o uso alternado de meio líquido e meio semi-sólido ao longo dos subcultivos, uma vez que a hiperidricidade tem sido um fator limitante no uso prolongado de culturas líquidas.

O uso da metodologia de gotejamento pode ser interessante quando se deseja o controle individual de cada explante, o que é dificultado em culturas líquidas. Tal controle é fundamental em pesquisas onde se deseja um acompanhamento por genótipo.

Um procedimento bastante utilizado em cultura de tecidos para induzir multiplicação é a quebra de dominância apical. Neste caso, é necessário um corte vertical no centro do explante, o que resulta na formação de brotos adventícios. Esta prática, apesar de eficiente, não foi utilizada neste trabalho, a fim de evitar sua interferência na avaliação dos efeitos dos fitormônios testados.

Esta é apenas a fase inicial de um trabalho que tem como objetivo a obtenção de um protocolo eficiente de multiplicação para espécies nativas de *Vriesea*. Portanto, o material obtido neste estudo

continuará sendo avaliado nas etapas posteriores de alongamento, enraizamento e climatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AITKEN-CRISTIE, J.. Automation. IN: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. [ed.]. **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic,. P.363-388. 1991
- BAPTISTA, L.R. DE M.; LONGHI-WAGNER, H.M. (coord.).. Lista preliminar de espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Sociedade Botânica do Brasil** - Seção Regional do Rio Grande do Sul, 16 p. 1998
- BENZING D. H. **Bromeliaceae Profile of an Adaptive Radiation**. Ed. Cambridge. University press. 690 p. 2000.
- BUCKUP, L. <http://www.caire.bio.br/>. 2000.
- CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR E.. *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**. n.55, p.79-83, 1999.
- FISCHER, G.; ZIMMER, K.. Regeneration of germinating seeds *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Hannover, n.226, p.615-618, 1988.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K.. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. **Exp. Cell. Res.**, v.50, p.151-158, 1968.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T.. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience** **15**(5): 603-604. 1980

IUCN **Red List of threatened plants**. Cambridge: IUCN Publication Services Unit. 1997.

IUCN. **Red List of threatened plants**. Cambridge: IUCN Publication Services Unit. 1998.

KNUDSON, L.. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin** **14**: 214-217. 1946

LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C.. Bromélias na natureza. **Marigo Comunicação Visual LTDA**, Rio de Janeiro. p.183. 1993.

MEKERS, O.. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Acta Hort.** **78**: 311-320. 1977.

MEKERS, O.; VAN ONSEM, J. G.. *In vitro* propagation of *Vriesea* cultivars with other ornamental Bromeliaceae. **Acta Hort.** **131**: 125-130. 1983.

- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **30**: 247-249. 1992.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News** **1**: 70-72. 1993.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **J. Bromeliad Soc.** **44**: 120-124. 1994.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana** **16**: 147-149. 1995.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.40, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497. 1962.
- PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P.. **Cultivo Prático de Bromélias**. Editora UFV, Viçosa, 70p. 2000.

- POMPELLI, M.F.. Dissertação de Mestrado. **Morfogênese *in vitro*, propagação massal e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler.** Florianópolis, S.C. 93p. 2002
- RANKER, T.H.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; GILMARTIN, A.J.. Subfamilial phylogenetic relationships of Bromeliaceae: Evidence from chloroplast DNA restriction site variation. **Systematic Botany**, v.15, n.3, p.425-434. 1990.
- RAUH, W.. The bromeliad lexicon. **Blandford.** London. 1990
- REITZ, R.. Bromeliáceas e a malária-Bromélia endêmica: **Flora ilustrada Catarinense.** [s.l.:s.n.], 1983.
- RUNDEL, P.W.; DILLON, M.O.. Ecological patterns in the Bromeliaceae of the lomas formations of Coastal Chile and Peru. **Plant System Evolution**, Austria. V.212. n.3-4, p.261-278, 1998.
- SMITH, L. B.; DONWS, R. J.. Bromeliaceae (Pitcarnoideae). **Flora Neotropica Monografia N^o 14.**p.1-662. 1974.
- SMITH, L. B.; DONWS, R. J.. Bromeliaceae (Tillandsioideae). **Flora Neotropica Monografia N^o 14.** p.663-1492. 1977.
- SMITH, L. B.; DONWS, R. J.. Bromeliaceae (Tillandsioideae). **Flora Neotropica Monografia N^o 14.** p.1493-2142. 1979.

- STREHL, T.. Forma, distribuição e flexibilidade dos tricomas foliares usados na filogenia de Bromeliaceae. **Iheringia. Série Botânica**, v.31, p. 105-119. 1983.
- TEISSON, C.. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. **Acta Horticultural**, [s.l.], n.440, p.521-526, 1996.
- VACIN, E.; WENT, F. W.. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz.** 110: 605-613.
- WAECHTER, J.. **O epifetismo vascular na planície costeira do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, S.P., Brasil. 163p. 1992.
- WINKLER, S.. Die Ursachen der Verbreitungsmurter einiger Bromeliaceae in Rio Grande do Sul (Südbrasilien). **Flora**, n. 170, p.371-393. 1980
- WINKLER, S.. Die Bromeliaceae von Rio Grande do Sul (Südbrasilien). **Documenta Naturae**, n.3, p. 90. 1982.