

Otimização da micropropagação de bromélias ornamentais em sistema biofábrica.

Dal Vesco, Lírio Luiz¹; Ribeiro, Ronaldo José²; Guerra, Miguel Pedro³

¹ Bolsista PIPE/FAPESP, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais-RGV, Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, email: lirio@cca.ufsc.br; ² Eng. Agr. Atlântica Assessoria Agro Ambiental Ltda, Registro-SP, Fone (13) 3821 5045.; ³ Prof. Dr. RVG/Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, Fone (48) 3721-5331, email: mpguerra@cca.ufsc.br.

INTRODUÇÃO

A floresta tropical atlântica é considerada um bioma de alta diversidade e as bromélias são elementos importantes deste bioma, apresentando espécies com acentuado endemismo nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil (Reitz, 1983). As bromélias consistem em um subsistema ecológico complexo que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais, por apresentarem alto grau de especialização em função de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (Padilha 1978).

Em estudo realizado pela Conservação Internacional (CI) a Mata Atlântica ocupa o quarto lugar em diversidade de plantas entre os biomas do planeta, com vinte mil espécies das quais seis mil são endêmicas, o que corresponde a 3% das espécies endêmicas do mundo, apesar da destruição de 92,5% de sua área original de 1,2 milhões de Km². A região foi selecionada por apresentar menos de 30% de sua cobertura vegetal original, apresentando índices elevados de diversidade de mamíferos, anfíbios, répteis aves e plantas (Heywood, 1995).

A família Bromeliaceae é composta por 51 gêneros e aproximadamente 3500 espécies, todas nativas do Continente Americano, com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana*, que habita a costa ocidental da África. Taxonomicamente as bromélias estão divididas em três subfamílias: Pitcairnioidae, Bromelioideae e Tillandsioidae, baseando-se em análises comparativas entre as estruturas reprodutivas, as quais são consideradas conservativas, isto é, as alterações destas é pouca influenciadas pelo meio ambiente, comparativamente às estruturas vegetativas (Padilha, 1978, Reitz 1983).

Técnicas de cultura de tecidos incluem ferramentas que podem ser aplicadas à propagação massal e a conservação de bromélias em extinção. A micropropagação é uma técnica empregada na propagação clonal de espécies de bromélias ornamentais e também as ameaçadas, tais como: *Vriesea fosteriana* (Mercier & Kerbauy, 1992), *Vriesea hieroglyphica* (Mercier & Kerbauy, 1994), bem como algumas espécies nativas de Santa Catarina, tais como: *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (Alves & Guerra, 2001) e *V. Reitzii* (Rech Filho et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo gerar (bio)tecnologias para o estabelecimento de protocolos regenerativos para a micropropagação massal de bromélias com base em laboratórios biofábricas.

MATERIAL E MÉTODOS

Buscando alternativas ao uso de diferentes tipos de fitorreguladores na indução e seus efeitos morfogênicos, foram testadas diferentes concentrações de Tiazuron (TDZ), na proliferação múltipla de brotos em bromélias..

ENSAIO 1: O experimento obedeceu a um delineamento fatorial (2x5), com 10 tratamentos: duas espécies (*Vriesea fosteriana* e *Alcantharea imperialis*), em combinações com cinco concentrações de TDZ (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 µM), suplementados a formulação salina de MS. Cada unidade experimental foi constituída de três frascos por repetição com quatro grupos de brotos/frascos e 5-6 brotos por grupo de brotos, arranjadas na forma blocos completos casualizados (BCC), com três repetições. Dados de número de brotos foram coletados após 13 semanas da inoculação.

ENSAIO 2: Efeito do TDZ na regeneração de microbrotos de *V. splendens* híbrida, espécie que apresenta um grande potencial comercial. O delineamento do experimento foi

um DCC, com brotos de *V. splendens* híbrida, cultivados em meio de cultura MS, suplementados com cinco níveis de TDZ (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 μM). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaios por repetição com em média 0,084 g/tubo de peso fresco de microbrotos, arranjados na forma de blocos completos casualizados (BCC), com quatro repetições. Dados peso fresco de brotos foram coletados após 13 semanas da inoculação.

Microbrotos de *V. splendens* híbrida originados do cultivo em frascos do quinto subcultivos *in vitro* foram à fonte de explantes para um ensaio de alongamento, onde foram testados diferentes concentrações de ácido giberélico-AG₃.

ENSAIO 3: O delineamento foi em blocos completos casualizados (BCC) com seis tratamentos, onde foram testados seis níveis de AG₃ (0, 2, 4, 6, 8 e 10 μM). As unidades experimentais foram constituídas de cinco tubos de ensaios com grupos de brotos com em média 0,084 g de peso fresco por tubo, arranjadas em blocos com quatro repetições. Dados peso fresco de brotos foram coletados após 13 semanas da inoculação.

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste SNK (5%) de separação de médias, segundo as recomendações Compton (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para um sistema de biofábrica é de fundamental importância determinar todas as possibilidade e alternativas de uso e tipo de fitorreguladores que podem ser utilizados na indução a proliferação de brotos. A determinação de um só protocolo pode comprometer a produção, principalmente quando não se tem ainda o controle de todo o processo. Por isto foram testadas diferentes concentrações de Tidiazuron (TDZ) para avaliar seus efeitos morfogênicos na proliferação múltipla de brotos em bromélias ornamentais.

Resultados preliminares com o uso de TDZ (0,1 μM) para a multiplicação de *Vriesea fosteriana* e *Alcantarea imperialis*, espécies de grande importância ornamental e comercial, mostraram que este fitorregulador proporcionou um maior número de brotos (14,3 brotos/explante) para *V. fosteriana*, quando comparada com a produção de brotos da *Alcantarea imperialis* (5,3 brotos/explante) após 13 semanas em cultivo (Tabela 1).

Em *V. fosteriana* a maior ocorrência de brotos (mais de 90%) ocorreu entre as classes de menor tamanho (< 1 cm), o que foi associado ao cultivo com a suplementação de concentrações superiores a 0,1 μM de TDZ. Comportamento semelhante também foi observado com a espécie *Alcantarea imperialis*, onde a maior ocorrência de brotos nas classes de tamanho foi promovida pelos maiores níveis de TDZ.

A proliferação de microbrotos de *V. splendens* híbrida medida pelo peso fresco, resultou em valores não significativos quanto à suplementação do TDZ ao meio de cultura MS após 13 semanas em cultivo. O maior aumento de peso fresco sobre o inóculo inicial (15,3), foi observado no meio de cultura MS isento de fitorreguladores. O segundo aumento (13 vezes) ocorreu em resposta ao uso de 10 μM de TDZ (dados não mostrados).

O uso de qualquer concentração de AG₃ induziu o alongamento inicial dos microbrotos (Tabela 2). Porém foram necessárias sucessivas repicagens para inibir a proliferação e promover um maior alongamento de brotos. A proporção de aumento de peso fresco dos microbrotos diminuiu com o aumento das concentrações de AG₃ suplementado ao meio de cultura basal MS.

Em subcultivos sucessivos observou-se que as concentrações mais elevadas de AG₃ testadas resultaram revelaram um maior alongamento de brotos. Por outro lado, meios de cultura isentos deste fitorregulador resultaram principalmente na proliferação e reduzido alongamento dos microbrotos.

O sistema proposto pode ser resumido na Figura 1 onde é apresentado um fluxograma dos principais procedimentos a serem empregados em um laboratório-biofábrica de bromélias e que foi desenvolvido para a o laboratório da Empresa Atlântica-Registro-SP.

Tabela 1. Número médio de brotos por explante de *V. fosteriana* e *A. imperialis*, cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com TDZ (0; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 μ M), 13 semanas após a inoculação.

Tratamentos	Número de brotos/explante		
	<i>Vriesea fosteriana</i>	<i>Alcantarea imperialis</i>	Média
0,1	14,3 a	5,3de	9,8 A
1	10,9 b	4,3 def	7,6 B
10	8,8 bc	3,5 def	6,2 BC
0,01	4,3 cd	6,5 cd	5,4 C
0 (MS-Testemuna)	1,5 f	3,0 df	2,3 D
Média geral	8,0 A	4,5 B	6,2
CV (%)	21,2		

Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes minúsculas (entre fatores: nível de TDZ x espécie), e maiúsculas - na linha entre espécies e na coluna entre níveis de TDZ, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

Tabela 2. Incremento de peso fresco dos microbrotos de *V. splendens* híbrida, cultivados em meio MS suplementado com GA₃ (0; 2; 4; 6; 8 e 10,0 μ M) após 13 semanas em cultura.

AG ₃ (μ M)	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	Aumento de peso	Proporção de aumento de peso
0	0,085	1,470	1,385 A	17,6 A
2	0,083	1,102	1,019 A	15,2 A
4	0,084	1,303	1,219 A	15,9 A
6	0,077	1,138	1,062 A	14,9 A
8	0,085	1,208	1,124 A	14,5 A
10	0,088	1,258	1,169 A	14,4 A
Média geral	0,084	1,247	1,163	15,416
CV (%)			16,4	15,9

Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas (na coluna) indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = Coeficiente de variação

CONCLUSÃO

O uso de 0,1 μ M de TDZ suplementado ao meio de cultura MS resulta em altas taxas de proliferação (14,3 brotos) de *V. fosteriana*. Além de ser uma alternativa para promover a proliferação múltipla de brotos em bromélias este procedimento possibilita o uso de concentrações baixas deste fitorregulador (0,1 μ M), quando comparada ao uso de BAP (4 μ M). Este fator pode reduzir significativamente o custo de produção das mudas, considerando a quantidade utilizada e o custo do produto. Mesmo em doses baixas de TDZ observou-se uma quebra da dominância apical dos aglomerados de microbrotos, o que pode aumentar a taxa de regeneração. Isto possibilita a sincronização nesta fase e permite o emprego AG₃ na próxima fase para promover o alongamento dos brotos. O alongamento e crescimento final dos microbrotos ocorrem com a sua repicagem para meios de cultura isentos de fitorreguladores. Quando originados de meios de cultura contendo TDZ são necessários vários subcultivos em sucessão com concentrações de 5 e 10 μ M de AG₃ para ocorrer o alongamento sincronizado destes microbrotos. O sistema assim desenvolvido permite o seu emprego em biofábricas acopladas ao uso de biorreatores de imersão temporária.

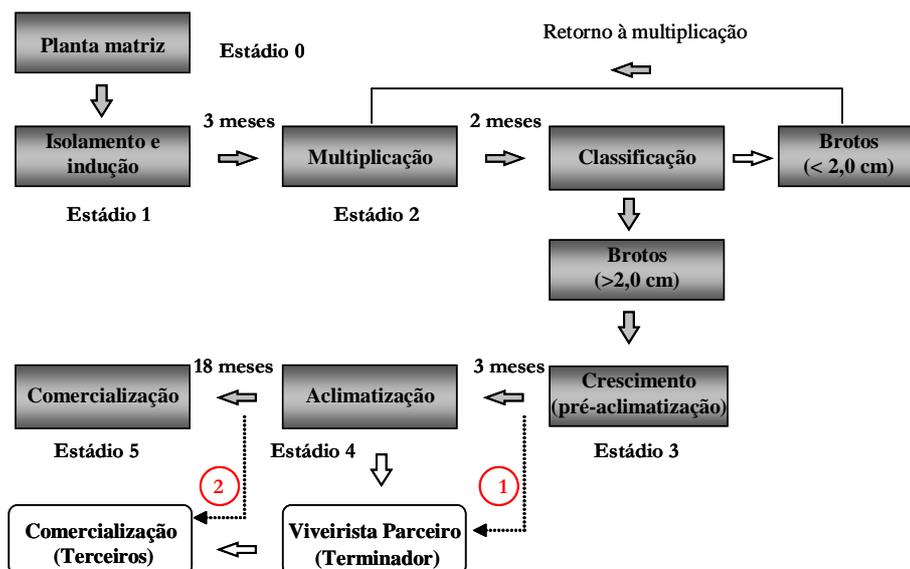


Figura 1. Fluxograma esquemático utilizado na biofábricas de mudas de bromélias ornamentais utilizado no Laboratório da Empresa Atlântica- Registro-SP. (1) e (2)= estratégia firmada com terceiros. Adaptado de Dal Vesco et al. (2001b).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.M. & GUERRA, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** n.37, p.217-242,1994.
- DAL VESCO, L.L.; PINTO, A. DE A. ZAFFARI, G. R.; NODARI, R.O. REIS, M. S. Dos; & GUERRA, M.P.; Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**. v.56, p.143-154, 2001.
- HEYWOOD, V.H. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge. UNEP/Cambridge University Press. 1140p. 1995.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. In vitro culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Bromeliad Soc.** v.44, p.120-124, 1994.
- MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.30, p.247-249, 1992.
- PADILHA, V. (1978) Bromeliads: New York, Crow Publishers Inc, 134p.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L. NODARI, R.O. LISCHKA, R.W. MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**. V. 14, p. 1799-1808, 2005.
- REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues. 1983, 559 p.

PALAVRAS-CHAVES: *Vriesea fosteriana*; *Alcantarea imperialis*; *V. splendens*; Bromeliaceae; Biofábrica; cultivo *in vitro*.