



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



MARCELO FRANCISCO POMPELLI

M O R F O G Ê N E S E *in vitro*,
M É T O D O S D E
M I C R O P R O P A G A Ç Ã O E
C O N S E R V A Ç Ã O D E
G E R M O P L A S M A D E *Dyckia*
distachya Hassler

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra.

Co-orientador: Prof. Maurício Sedrez dos Reis.

Florianópolis (SC), fevereiro de 2002.

Permitida a reprodução total ou parcial dos textos e dados aqui contidos, desde que seja citada a fonte.

POMPELLI, Marcelo Francisco

Morfogênese *in vitro*, Métodos de Micropropagação e Conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler. Dissertação de Mestrado. Marcelo Francisco Pompelli. CCB/MIP/UFSC/ Florianópolis, 2002.

93p.; 21 x 29,7 cm.

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina

Micropropagação, *Dyckia distachya*, Organogênese, Embriogênese, Conservação de Germoplasma.

“Morfogênese *in vitro*, Propagação Massal e Conservação de Germoplasma de Dyckia distachya Hassler.”

POR

MARCELO FRANCISCO POMPELLI

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Comissão Examinadora:



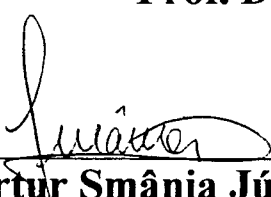
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Orientador – FIT/CCA/UFSC



Dr.ª Monique Inês Segeren
Proclone – Campinas-SP



Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
FIT/CCA/UFSC



Prof. Dr. Artur Smânia Júnior – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Fevereiro de 2002.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as dificuldades, muitos foram os atropelos, as dúvidas, no entanto, como diz o ditado, depois da tempestade vem a bonança. Assim como uma singela e rupestre bromélia, seus espinhos aduncos não afugentam belas e coloridas borboletas – é doce o néctar da conquista.

Nesse momento é ora de agradecer a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o sucesso deste. Aos meus pais, Domingos e Lourdes Pompelli, meu muito obrigado. Aos professores Miguel Pedro Guerra, Maurício Sedrez dos Reis, Rubens Onofre Nodari e tantos outros meus sinceros cumprimentos, pois esse trabalho é uma conquista mútua. Aos técnicos da UHI, por terem permitido os trabalhos de pesquisa a campo e a doutora Teresia Strehl pelas orientações sistemáticas, meu muito obrigado.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, deve-se agradecer a técnica Maria Luisa Peixoto pelas orientações básicas, ao mestre Lírio Luiz Dal Vesco, pela ajuda estatística, a mestrandia Gabriela C. Cangahuala Inocente, pelo fornecimento de bibliografias e opiniões sempre fundamentadas a cerca do tema. E sendo assim, estendo meus agradecimentos a tantos outros que contribuíram para o bom andamento dos trabalhos aqui apresentados.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho as bromélias como um tal, em especial *Dyckia distachya* a qual foi alvo desse trabalho.

Dedico também a colega, amiga e namorada Tatiana Hertel Pinto, para a qual deixei muitas vezes de dar atenção, para me infurnar em livros, publicações e na escritura deste. Sei que muitas vezes, esperava algo mais de mim, mas na maioria das vezes me encontrava pensativo e cabisbaixo, querendo saber qual seria o próximo passo. É por estes e por tantos outros motivos que dedico esse trabalho a essa maravilhosa pessoa.

Charles Plumier, explorador francês, viajava pela região das Antilhas, no final do século XVII, quando se deparou com um conjunto de plantas invulgares, que os nativos chamavam de karatas. Retornando a sua terra natal, decidiu dar a elas um outro nome "mais digno e expressivo" do que aquele tão "primitivo". Aproveitou então, a oportunidade para homenagear o botânico sueco Olaf Bromel. Em 1753, Linné – criador do moderno sistema binomial de nomenclatura científica – oficializou o nome dado por Plumier às plantas, estabelecendo assim o gênero Bromélia.

Nós amamos nas bromélias o caráter, por assim dizer o clássico, dos seus contornos, a sua forma é de uma ânfora, de um vaso grego ou de uma roseta; suas folhas descrevem curvas corretas, seus tecidos são firmes e sua superfície é freqüentemente ornada com zebrunas ou coloridos diversos; algumas defendem seus frutos com armas aceradas. Suas flores são quase sempre atraentes e sempre de longa duração. Têm belos enfeites e nada pediram a perfumaria..."

(Eduardo Morren, botânico belga, enfeitado, com seus conterrâneos europeus, pela beleza rara das bromélias)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Capítulo I – Introdução, Justificativas e Objetivos	
1 – Introdução e Justificativa	01
2 – Descrição Botânica	05
3 – Justificativa e Objetivos	07
3.1 – Objetivo Geral	07
3.2 – Objetivos Específicos	08
Capítulo II – Micropropagação por Organogênese Direta	
1 – Introdução e Justificativa	10
2 – Materiais & Métodos	12
2.1 Indução de brotações diretamente das sementes	12
2.2 Indução de brotações após o desenvolvimento das plântulas	13
2.2.1 Transferência <i>ex vitro</i> e aclimatização	14
3 – Resultados e Discussão	15
3.1 Indução de brotações diretamente das sementes	15
3.2 Indução de brotações após o desenvolvimento das plântulas	20
3.2.1 Transferência <i>ex vitro</i> e aclimatização	25
Capítulo III – Indução à Embriogênese Somática	
1 – Introdução e Justificativa	36
2 – Materiais & Métodos	39
2.1 Órgãos Florais	39
2.2 Bases Florais	40
2.3 Embriões Zigóticos	41
2.4 Avaliações Histológicas	43
3 – Resultados e Discussão	43
Capítulo IV – Enraizamento e Aclimatização	
1 – Introdução e Justificativa	55
2 – Materiais & Métodos	57
2.1 – Enraizamento <i>in vitro</i>	57
2.1.1 – Adequação da concentração ótima de AIB	57
2.1.2 – Adequação do tempo ótimo para indução com AIB	57
2.2 – Enraizamento <i>ex vitro</i>	58
3 – Resultados e Discussão	59
3.1 – Enraizamento <i>in vitro</i>	59
3.2 – Enraizamento <i>ex vitro</i>	61
Capítulo V – Conservação de Germoplasma	
1 – Introdução e Justificativa	66

2 – Materiais & Métodos	69
2.1 – Coleta das plantas e banco de germoplasma <i>ex vitro</i>	69
2.2 – Banco de Germoplasma <i>in vitro</i>	70
2.2.1 – Teste de Germinação	70
2.2.2 – Manutenção das culturas <i>in vitro</i>	70
2.3 – Banco de Sementes	71
3 - Resultados e Discussão	71
3.1 – Coleta das plantas e banco de germoplasma <i>ex vitro</i>	71
3.2 – Banco de Germoplasma <i>in vitro</i>	72
3.2.1 – Teste de Germinação	72
3.2.2 – Manutenção das culturas <i>in vitro</i>	73
3.3 – Banco de Sementes	74
Síntese dos Principais Resultados	78
Considerações Finais e Perspectivas Futuras	79
Referências Bibliográficas	80
Anexo – Resumo das Análises de Variância	90

RESUMO

Na época do descobrimento, a Mata Atlântica abrangia uma área de 1.227.600km²; atualmente os seus remanescentes não passam de 8% do original. A floresta foi destruída para fins madeireiros, para dar lugar à agricultura e para o "progresso das cidades". Outra problemática enfrentada no Estado de Santa Catarina foi a instalação de usinas hidroelétricas, atividade que, por devastar grandes áreas, altera o ecossistema natural. No Brasil a maior ocorrência de bromélias situa-se no domínio da Mata Atlântica, cujo processo de devastação, aliado ao endemismo, ameaça de extinção um grande número de espécies. *Dyckia distachya* é uma bromélia endêmica da região oeste do Estado de Santa Catarina, onde se formou o reservatório da Usina Hidroelétrica de Itá, sendo listada na categoria de sério risco de extinção. Neste sentido, técnicas de cultura de tecidos vegetais, com ênfase à conservação são técnicas de grande aplicabilidade. Assim, este trabalho procurou desenvolver metodologias para micropropagação massal, visando principalmente a conservação de germoplasma de *Dyckia distachya*, tendo como base a utilização de sementes como explantes, objetivando a manutenção da estrutura genética original dessas populações. Num primeiro sistema, duas formas de cultivo *in vitro* foram testadas. Quando sementes foram inoculadas em meio de cultura MS, líquido, suplementado com BAP (20µM), obteve-se 78,93 brotos por grama de inóculo aos 120 dias de cultivo. Neste mesmo meio de cultura, suplementado com BAP (1µM) foram induzidos 20,30 brotos por explante. Quando plântulas foram utilizadas obteve-se a indução de 133,58 brotos por explante em meio de cultura MS, suplementado com ANA (2µM); BAP (4µM); PBZ (6µM) em fase líquida, no quarto subcultivo aos 142 dias de cultura. Assim é perfeitamente possível a obtenção de mais de 900 plântulas após 120 dias de cultivo. Com a utilização de um sistema de enraizamento *in vitro* na presença de AIB (12,5µM) pôde-se induzir enraizamento em mais de 94% dos explantes, os quais mostraram 5,13 raízes por plântula e comprimento médio de 15,34mm. Com isso, quando aclimatizadas mais de 92% destas plântulas sobreviveram a campo após 120 dias. O enraizamento *ex vitro*, induziu a formação de raízes frágeis e em pequeno número, observando-se menor taxa de sobrevivência, a qual não passou de 80%. Em um segundo sistema morfogênético, diferentes explantes foram utilizados para a indução embriogênética, sendo que os embriões zigóticos mostram-se mais eficientes. Neste sentido pode-se observar taxas de indução acima de 59% com formação de mais de 160 embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento por placa quando embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura MS, gelificado e suplementado com Picloram (1µM) + KIN (1µM). Resultados inferiores foram obtidos quando a auxina utilizada foi o 2,4-D. Não foi possível a conversão destes embriões somáticos em plântulas.. Este trabalho ainda descreve um sistema de conservação de germoplasma onde plântulas podem ser mantidas *in vitro*, em sistema livre de contaminantes e com repicagens em tempos superiores a 90 ou 120 dias.

Palavras-chave: bromélias, *Dyckia distachya*, organogênese, embriogênese, conservação de germoplasma.

ABSTRACT

At that time of the contact, the Atlantic Forest covered an area of 1.227.600km². Nowadays the remnants are restrict to an area of 8% of the original one. The deforestation was caused by lumber production, agricultural practices and to get place to the "progress of the cities". Other problem faced in the State of Santa Catarina was the installation of hydroelectric power, activity that alters the natural ecosystem. In Brazil the Atlantic Forest Domain is the main biome in which bromeliads occur, whose devastation process together with the endemism, threaten a great number of species. *Dyckia distachya* is an endemic bromeliad of the west region of Santa Catarina State, being classified in serious risk of extinction. Tissue culture techniques are considered a valuable tool for the mass propagation and conservation of endangered germoplasm. The overall aim of the present work was to establish micropropagation protocols for the conservation of this species, using mainly seeds as explants in order to assure the maintenance of the original genetic structure of natural populations. Two systems were used for the *in vitro* culture of *Dyckia distachya*. In a first system, when seeds were used as explant in a basal MS liquid culture medium, supplemented with BAP (20µM) the regeneration rate was 78.93 shoots per gram of original inoculum after 120 days in culture. With the same basal medium, supplemented with BAP (1µM) the regeneration rate was 20.30 shoot per explant. When plantlets were used as explants the regeneration rate was 133.58 shoots per explant in basal MS liquid culture medium supplemented with NAA (2µM); BAP (4µM); PBZ (6µM) in the fourth subculture. Thus it was possible to obtain more than 900 plantlets after 120 days in culture. For *in vitro* rooting the basal MS culture medium supplemented with IBA (12.5µM) resulted in 94% of rooting with an average of 5.13 roots per plantlets, a root length of 15.34mm, and a 92% survival rate after acclimatization. The *ex vitro* rooting induced the formation of fragile, low number roots with a 80% survival rate. In a second morphogenic system, different explants were used for the embryogenic induction, being the zygotic embryos the most responsive one. Embryogenic induction rates above 59% with the average formation of 160 embryos/plate in different developmental stages were observed in the semi-solid MS culture medium supplemented with Picloram (1µM) plus KIN (1µM). Low rates of embryogenic induction were obtained when the auxin source was 2,4-D. This work also describes a protocol for germoplasm conservation where the plantlets can be maintained *in vitro*, subcultures periods superior to 120 days.

Key-words: bromeliads, *Dyckia distachya*, organogenesis, embryogenesis, germoplasm conservation.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2,4,5-T – Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético
2-iP – 2-isopentenil ademina
A₂B₄ – 2μM de ANA + 4μM de BAP
ABA – Ácido Abscísico
AG₃ – Ácido Giberélico
ANA – Ácido Naftalenoacético
BAP – 6-Benzilamunopurina
BOD – Biologic Organisms Development
CCA – Centro de Ciências Agrárias
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CFL – Câmara de Fluxo Laminar
CV (%) – Coeficiente de Variação
DCC – Delineamento Completamente Casualizado
ES – Embrião Somático
EZ – Embrião Zigótico
FAA – Formalina 40%: Ácido Acético Glacial e Álcool 70% (5:5:90)
KC – Meio de cultura basal estabelecido por Knudson (1946)
KIN (Cinetina)
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
MS – Meio de cultura basal estabelecido por Murashige & Skoog (1962)
MIP – Departamento de Microbiologia e Parasitologia
PBZ – Paclobutrazol
PEG – Polietilenoglicol
Picloram – Ácido 4-amino-3,4,6-tricloro picolínico
SNK – Teste estatístico de Newman-Keuls
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UHI – Usina Hidrelétrica de Itá (Itá – SC)
TDZ – 1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-uréia
UR – Umidade Relativa

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As bromélias são plantas típicas do Continente Americano, provavelmente originárias do topo dos Andes. Suas espécies espalharam-se no decorrer dos milênios e alcançaram as florestas tropicais há cerca de 200.000 anos (Benzing, 2000). Não se sabe com clareza qual a amplitude da família Bromeliaceae, cujo número de espécies varia de 2000 a 3000 (Mercier & Kerbauy, 1997; Bernardello *et al.*, 1991; Leme, 1984; Reitz, 1983), todas elas nativas do Continente Americano, com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana*, que ocorre no oeste Africano (Bernardello *et al.*, 1991; Leme, 1984). As bromélias, tanto terrestres quanto epífitas, são encontradas até mesmo nas regiões mais desertas e secas do mundo, assim como observado por Rundel & Dillon (1998) no deserto do Atacama e Peruano.

As regiões mais ricas em bromélias do mundo são o México, as Antilhas, a Costa Rica, os Andes Colombianos, o Peru, o Chile e especialmente o leste e sul do Brasil (Rauh, 1990), em qual pode-se encontrar 700 espécies, todas exclusivas.

A família Bromeliaceae é subdividida em três subfamílias. A primeira delas, Pitcairnioideae é composta por 13 gêneros e 750 espécies (Rundel & Dillon, 1998), englobando, entre outras, os gêneros *Puya*, *Dyckia* e *Pitcairnia* (Mercier & Kerbauy, 1997). Atualmente a subfamília Pitcairnioideae é considerada como a mais primitiva (Galletto & Bernardello, 1992; Bernardello *et al.*, 1991; Leme, 1984; Medina & Troughton, 1974), porém Rundel & Dillon (1998) discutem que, embora controversos, os recentes estudos moleculares sugerem que as Tillandsioideae sejam as espécies basais e que as Pitcairnioideae e as Bromelioideae são as irmãs mais evoluídas. Aproximadamente todas as espécies que pertencem a estes grupos de plantas são terrestres ou saxícolas e muitas delas estão sendo usadas como plantas ornamentais. A dispersão das Pitcairnioideae acontece através do vento, via sementes aladas (Fischer & Araujo, 1995).

As espécies da subfamília Tillandsioideae possuem sementes plumosas, sendo também dispersas pelo vento (Fischer & Araujo, 1995). Composta por seis gêneros e 810 espécies (Rundel & Dillon, 1998), essa subfamília apresenta em

sua maioria espécies epífitas, no entanto as do gênero *Alcantarea* são todas terrestres e saxícolas, e nesta, os gêneros *Tillandsia*, *Vriesea* e *Guzmania* são os mais explorados.

Já a subfamília Bromelioideae, é composta por 27 gêneros e 536 espécies (Rundel & Dillon, 1998), sendo o gênero *Neoregelia* o mais importante comercialmente (Reitz, 1983). Estas são predominantemente epífitas com frutos em forma de baga e sementes dispersas por animais (Fischer & Araujo, 1995).

No Brasil, onde incidem 45% das espécies, o principal centro de origem e disseminação situa-se no domínio da Mata Atlântica, cujo processo de devastação, aliado ao endemismo, ameaça de extinção um grande número de espécies (Alves, 2000). Carneiro *et al.* (1999), descrevem que muitas espécies de bromélias podem estar em extinção, visto que seu habitat natural está sob intensa pressão das atividades humanas, sem contar que elas são extensivamente e ilegalmente coletadas para suprir o mercado de design paisagístico.

Reitz (1983), lista a presença de 140 espécies de bromélias no domínio da Mata Atlântica. Klein (1990), descreve que mais de 30 destas espécies estão em processo de extinção, incluindo-se nesta lista quatro espécies do gênero *Dyckia*, inclusive *Dyckia distachya*. Frente a este agravante, é de extrema importância a necessidade da criação de programas de conservação de germoplasma e propagação massal das diversas espécies (Alves, 2000; Carneiro *et al.*, 1999; Mercier & Kerbauy, 1995).

Atualmente a Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados de destruição no mundo (Heringer & Montenegro, 2000), não sendo mais uma floresta homogênea (Figura 1-B e C), e os fragmentos remanescentes não excedem 8% da área original. Visto que as bromélias são, em sua maioria, endêmicas, com a destruição de seus habitats naturais e o aumento da população humana, bem como com a ação indiscriminada do homem sobre o meio ambiente, elas correm sérios riscos de extinção (Carneiro *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 1998).

Originalmente a Mata Atlântica se estendia do Estado do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, alcançando uma área de 1.227.600km² ou 12% do território brasileiro (Heringer & Montenegro, 2000). Sendo estas regiões altamente demográficas, com uma alta densidade urbana ($\pm 43\%$ da população brasileira) (Fonseca, 1985), a Mata Atlântica foi desmatada e queimada para dar lugar aos

“avanços” das cidades, o que fez restar de 5 a 12% de sua área original. Os poucos isolados remanescentes encontram-se espalhados por uma paisagem dominada por pastagens e atividades agrícolas (Chiarello, 1999).

Nas bromélias podem ser encontradas as mais variadas formas de vida. Suas cisternas desempenham a função de charcos e lagos pênseis, com microflora e microfauna especiais. Desenvolvendo-se lado a lado, as orquídeas introduzem suas raízes entre as folhas das bromélias onde têm suprimento perene de água e alimentos. Mais dependentes ainda da umidade e dos nutrientes das cisternas das bromélias, são algumas espécies de aráceas. Com frequência, observa-se, no domínio da Mata Atlântica em Santa Catarina, exemplares jovens de *Philodendron selloum* e *P. melanorrhizum* se desenvolvendo nas rosetas de espécies de *Vriesea*, *Aechmea*, *Nidularium*, *Neoregelia*, *Canistrum*, *Wittrockia* e *Hohenbergia*, tanto que se tem a convicção de que normalmente a germinação e o desenvolvimento das plantas jovens, destas aráceas, dependem como que exclusivamente do meio úmido dos terrários e aquários das bromélias. Dentre os animais que seguidamente são encontrados no meio bromelícola, as pererecas, lagartixas, pequenas cobras, caranguejos de água doce e salgada, aranhas, escorpiões, centopéias, libélulas, grilos, gafanhotos, besouros, percevejos aquáticos, formigas de diversas espécies e lesmas são as mais comuns (Santos & Almeida, 1998; Adeodato, 1997; Reitz, 1983). Em virtude da capacidade de armazenar água, algumas bromélias são verdadeiras cisternas naturais. Com altura que pode chegar a quatro metros, a *Alcantarea imperialis*, na Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro, consegue acumular até 30 litros de água, onde pode-se encontrar desde aves, roedores e primatas alojados em suas cisternas. Outras, como a *Tillandsia*, são do tamanho de uma caixa de fósforos e só absorvem água da atmosfera por meio das folhas (Leme, 1984).

Biologicamente, as epífitas são comensais: elas e as suas árvores hospedeiras mostram uma estreita associação sem prejuízo a nenhuma delas. Em todos os casos, as epífitas são beneficiadas por altos níveis de luz solar, e por evitar uma possível competição com ervas e musgos no chão. Apesar disso algumas epífitas podem ser consideradas como parasitas quando introduzem suas raízes no sistema vascular, debilitando as copas das árvores, causando perda do vigor e eventual morte da planta hospedeira (Nadkarni, 1985).

Na década de 50, devido a um grande surto de malária, o governo federal criou o Serviço Nacional da Malária (SNM) e através de estudos, constatou-se que a proliferação de mosquitos do gênero *Anopheles* se dava nas águas armazenadas na roseta foliar das bromélias, e não nas águas estagnadas dos brejos. Sabendo disso, foram lançadas campanhas para total erradicação de bromélias dentro e ao redor das cidades catarinenses. Só em Florianópolis, de 1944 a 1950, foram retiradas manualmente 15.981.431 bromélias, de fato acabando com os casos de malária nesta cidade. Em Santa Catarina, o total de bromélias retiradas manualmente foi computado em 74.194.284 unidades. O desmatamento alcançou 27.300.670 metros quadrados, e contando-se nove bromélias por metro quadrado, temos um total de 245.706.030 bromélias destruídas. Somando-se ao todo, chegamos ao número fantástico de 319.900.314 unidades. Foi o preço pago para pôr a malária sob controle em algumas cidades do Sul do país (http://www.br.geocities.com_bromelia98caeg).

Após essa catastrófica ação, foram realizados estudos de caracterização das espécies de bromélias da Mata Atlântica. Nestes foram demonstrados que as espécies do gênero *Dyckia*, apesar de suas folhas estarem dispostas em densa roseta basal, não formam um receptáculo adequado para a retenção das águas pluviais, não procriando, portanto, mosquitos transmissores da malária (Reitz, 1983; Klein, 1990). Entretanto, milhares de espécimes de *Dyckia* também foram destruídas nas campanhas descritas acima.

Diversos gêneros de Bromélias estão se tornando populares como plantas de potes, em particular *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker e *Cryptanthus sinuosus* (Carneiro *et al.*, 1998), as quais estão sendo micropropagadas com sucesso para propósitos comerciais. Porém muitas bromélias brasileiras no mercado são indiscriminadamente coletadas na mata (Mercier & Kerbauy, 1993; Leme, 1984).

Os métodos naturais de propagação são incapazes de produzir um grande número de plantas, em um curto prazo, como requisitado para os fins comerciais (Mercier & Kerbauy, 1995). Neste sentido, a propagação de plantas através da técnica de cultura de tecidos tem muitas vantagens. Geralmente, são alcançadas taxas de multiplicação mais altas pelos métodos *in vitro* de que através da propagação convencional.

As bromélias podem ser propagadas através de processos sexuados ou assexuados. Os processos sexuados envolvem a formação da semente da qual grandes quantidades de plantas podem ser obtidas, e por este processo, a variabilidade genética da população original pode ser mantida (Mercier & Kerbauy, 1997). Entretanto, segundo Daquinta *et al.* (1999) a propagação sexual tem algumas desvantagens: uma delas é a produção limitada de sementes.

É possível ainda, concentrar a eficácia da germinação *in vitro* com a clonagem de genótipos. Fischer & Zimmer (1988) afirmam que as sementes germinadas *in vitro* num meio com fitorreguladores geralmente desenvolvem mais do que um broto, porém estes são clones da semente produzida sexualmente, sendo desconhecido seu parentesco e seu genótipo, bem como seu fenótipo. Em outra via, a reprodução assexual é incapaz de produzir a quantidade de plantas requisitadas nos procedimentos comerciais (Hosoki & Asahira, 1980).

As bromélias ornamentais estão aumentando sua importância econômica em muitos países. O desenvolvimento de métodos de micropropagação tem permitido a exploração eficiente de diversas espécies decorativas, desde que a multiplicação vegetativa natural pode ser considerada muito baixa, produzindo pouquíssimos brotos por planta (Mercier & Kerbauy, 1997; Hosoki & Asahira, 1980). Não obstante, com a cultura de tecidos obtêm-se mudas uniformes, de alta qualidade e livre de doenças e/ou mantendo tais doenças controladas (indexadas), permitindo, ainda, a multiplicação rápida e geneticamente confiável de novos cultivares e híbridos (Zornig, 1996).

2. DESCRIÇÃO BOTÂNICA

As bromélias pertencem a Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Ordem Bromeliales. Esta ordem possui apenas uma família – Bromeliaceae, a qual subdivide-se em três subfamílias: Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. As bromélias são classificadas como monocotiledôneas herbáceas, geralmente acaules, com folhas densamente embricadas na base, dispostas em rosetas, grossas, lanceoladas, largas, de bordas geralmente espinhosas, recobertas por pêlos ou escamas. Suas inflorescências podem se localizar no interior das folhas, como em *Nidarium*,

Neoregelia e *Cryptanthus*, ou se projetar para o exterior através de uma haste, geralmente protegidas por brácteas coloridas, como nos gêneros *Bilbergia*, *Aechmea* e *Dyckia*.

Dyckia distachya corre sérios riscos de extinção (Klein, 1990). Espécie característica e exclusiva das ilhas ou margens rochosas nas corredeiras do rio Uruguai e do rio Paraná, apresentando restrita, irregular e descontínua dispersão. Com a construção da Hidrelétrica de Itá, de Machadinho e outras em projeto no oeste do Estado de Santa Catarina, sua sobrevivência será bastante improvável, uma vez que, ao longo do rio Paraná, esta espécie já desapareceu completamente. Em virtude da formação do lago da barragem de Itaipú que cobriu toda a área das margens rochosas deste, pequenos agrupamentos, sobretudo no lado do Paraguai, ficaram submersos, visto o fato desta ser considerada por Cândido (1996) e Fischer & Araujo (1995) como uma espécie altamente endêmica.

Planta rupestre e reófito, provida de numerosas folhas dispostas em bela roseta, as folhas de 12-20cm de comprimento, são rijas, acanalado-côncavas especialmente para o ápice, com numerosos espinhos aduncos nas margens, dirigidos para cima e ponta agudíssima. Inflorescência de saída lateral, pouco tortuosa, de 70 a 130cm de altura, em geral formando panícula terminal de 2-8 ramos, flores amarelado-alaranjadas, muito semelhante a *D. brevifolia*, da qual se distingue, principalmente, pelo maior número de folhas, bem como inflorescência mais vigorosa (Reitz, 1983).

Espécie heliófita ou de luz difusa, adaptada as variações extremas de enchentes e vazantes, sendo uma de suas principais curiosidades, pelo fato de resistirem a essa alternância, ora suportando períodos muito secos na estiagem, ora ficando submersas durante as cheias do rio. *Dyckia distachya* Hassler era exclusiva das margens rochosas do Rio Uruguai, no município de Concórdia e Marcelino Ramos (Strehl, 1994). As espécies de *Dyckia* são altamente endêmicas, provavelmente como consequência da produção de sementes que não induzem os potenciais agentes de dispersão, restringindo-se apenas a dispersão anemófila (Cândido, 1996). Bernardello *et al.* (1991), afirmam que os beija-flores são os principais polinizadores das bromélias, podendo ainda ser relatados a presença de borboletas (*Papilio thoas*), e abelhas européias (*Apis mellifera*).

Florescem entre novembro e fevereiro sendo de fácil cultivo em vasos e em jardins (Strehl, 1994). Segundo Galetto & Bernardello (1992), as flores das espécies de *Dyckia* duram geralmente mais de um dia, ao contrário das outras da família, nas quais o florescimento é rápido e pouco duradouro.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

No presente trabalho avaliou-se a indução e expressão de rotas morfogênicas *in vitro* de *Dyckia distachya*, testando-se diferentes combinações de fitorreguladores e fontes de explantes em distintos sistemas de micropropagação, especificados em cada experimento, visando a propagação massal e a conservação de germoplasma.

Estudos desta ordem podem auxiliar em muito o desenvolvimento de protocolos adequados de micropropagação para diversas espécies desta família, constituindo assim uma ferramenta de grande valia para reproduzir em espaços mais curtos de tempo e em maior volume, muitas espécies que estão em risco de extinção, possibilitando também a criação de um banco de germoplasma *in vivo* e *in vitro* das espécies características do nosso Estado.

A escolha da espécie deve-se pelo sério risco de extinção em que a mesma se encontra, devido às alterações na paisagem no seu centro de dispersão, e por ser esta uma espécie altamente endêmica.

Sob o aspecto da cultura de tecidos, a principal justificativa para seu estudo relaciona-se a ausência de um protocolo de micropropagação para *Dyckia distachya* na literatura específica. Nestas condições, observa-se que sementes podem ser germinadas, dando origem a plantas que se submetidas aos processos rotineiros de cultura de tecidos podem originar inúmeras plântulas que após enraizadas e aclimatizadas podem fornecer um grande número de mudas, as quais podem ser então utilizadas para a reposição desta espécie na natureza, bem como para suprir o mercado paisagístico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Estabelecer protocolos regenerativos *in vitro* relacionados com a indução e controle da organogênese e embriogênese somática em *Dyckia distachya* Hassler;
- 3.2.2. Avaliar o efeito de diferentes fitorreguladores e composições de meios de cultura sobre a morfogênese *in vitro*;
- 3.2.3. Avaliar a competência morfogenética *in vitro* de diferentes tipos de explantes;
- 3.2.4. Desenvolver e otimizar protocolos para a conservação de germoplama *in vivo* e *in vitro*.

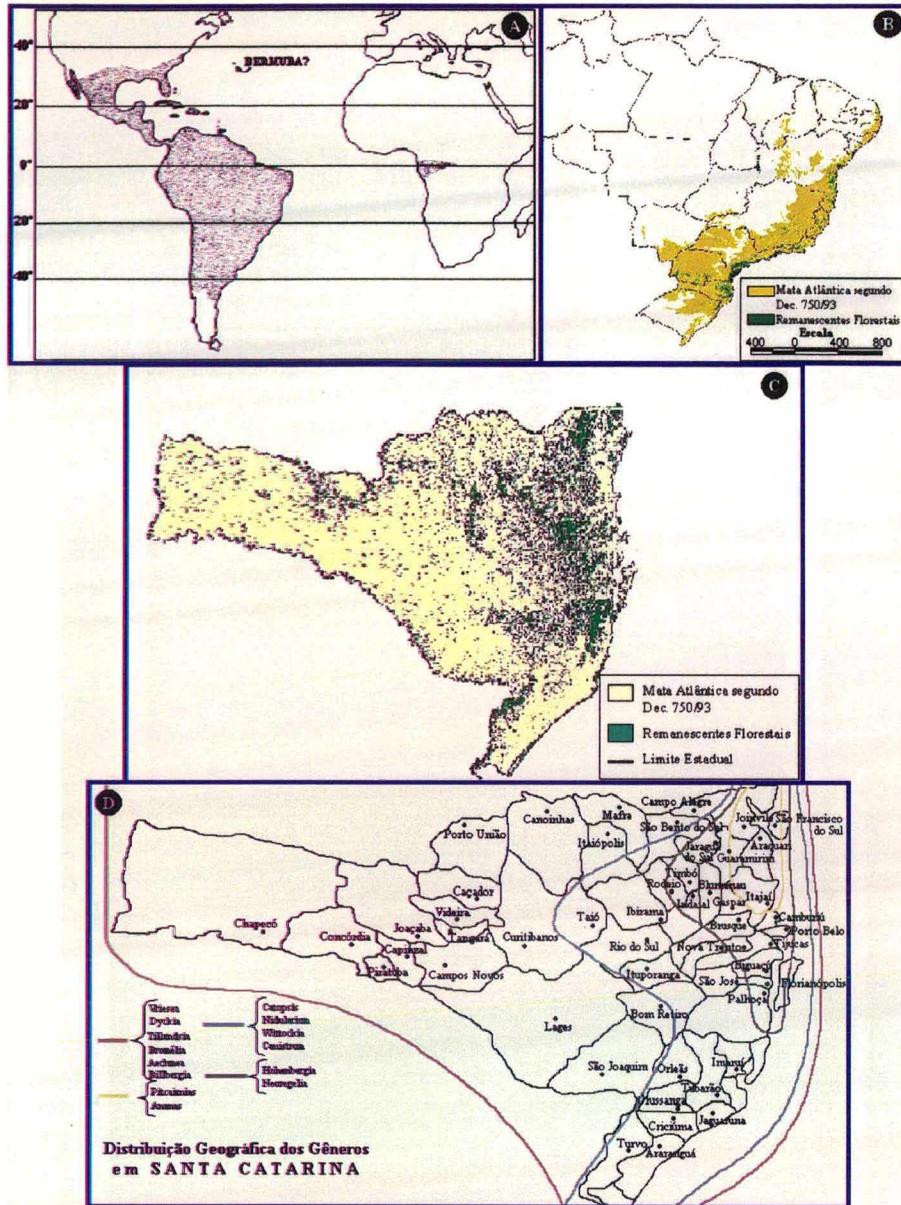


Figura 1 – Distribuição das bromélias no mundo (A). Remanescentes da Mata Atlântica no Brasil (B) e em Santa Catarina (C). Distribuição geográfica das bromélias em Santa Catarina (D).

CAPÍTULO II
MICROPROPAGAÇÃO
POR ORGANOGÊNESE
DIRETA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Mundialmente, milhões de mudas são micropropagadas *in vitro* por ano. Uma pequena fração é de mudas de bromélias, as quais começam a chegar na mão dos viveiristas (Zornig, 1996). A produção *in vitro* de bromélias já oferece ao mercado plantas de melhor qualidade, o que concorrerá para a redução do processo extrativista destas bromélias na natureza e contribuirá para uma maior preservação das espécies nativas.

Os métodos naturais de propagação são incapazes de produzir um grande número de plantas, em curto prazo, como requisitado para os fins comerciais (Daquinta *et al.*, 1999; Mercier & Kerbauy, 1995) ou mesmo para recuperar áreas impactadas (Carneiro *et al.*, 1999).

Plantas com metabolismo CAM, como algumas bromélias, são de crescimento lento, o que as vezes limita sua capacidade reprodutiva com condições limitadas ou muito específicas de florescimento, produção de sementes, germinação e conseqüentemente produção de mudas. Não obstante, os métodos de propagação convencionais são muito mais lentos. Uma alternativa seria a propagação destas por cultura de tecidos, uma vez que seguem uma rápida e continua produção de plantas. Além disso, a cultura *in vitro* é uma técnica valiosa, potente método para a conservação de plantas ameaçadas de extinção (Malda *et al.*, 1999).

Acredita-se que, quase sem exceções, as bromélias podem ser micropropagadas. Essa técnica se faz necessário quando se quer a obtenção de uma muda uniforme, de alta qualidade e livre de patógenos. Permite também a multiplicação rápida e geneticamente confiável de novos cultivares e híbridos e, em termos ecológicos, pode ser utilizada na preservação e propagação de espécies ameaçadas (Zornig, 1996).

Um dos problemas relacionados com a micropropagação de bromélias refere-se ao estabelecimento de culturas assépticas. Diversos autores descrevem métodos de desinfestação do material a ser introduzido em cultura *in vitro*. A imersão em álcool 70% costuma variar de 10 segundos a 3 minutos (Alves, 2000; Daquinta *et al.*, 1999; Mercier & Kerbauy, 1998 e Tombolato *et al.*, 1991). A imersão em hipoclorito de sódio pode conter de 1 a 5% de cloro ativo (Daquinta *et al.*, 1999;

Carneiro *et al.*, 1999, 1998; Mercier & Yoshida, 1998; Tamaki & Mercier, 1997; Mercier & Kerbaudy, 1998, 1993, 1992), e tempos que variam de 10 a 60 minutos dependendo do material. Tombolato *et al.* (1991) descrevem a utilização de hipoclorito de cálcio 1,5% por 10 minutos. Pode-se, ainda adicionar ao processo de lavagem Tween-80 ou ainda os antibióticos Penicilina e Estreptomicina como proposto por Teng *et al.* (1997).

Teng *et al.* (1997) conseguiram produzir 10^6 plantas por ano partindo de uma única planta com cinco nódulos de *Spathoglottis plicata*, quando utilizaram concentrações adequadas de auxina (ANA) e citocinina (BAP).

De acordo com Aitken-Christie (1991), a consistência do meio de cultura também pode afetar os índices de produtividade em sistemas de micropropagação. Meios de cultura líquidos e gelificados são muito utilizados em diferentes protocolos de cultivo *in vitro*, apresentando contudo algumas desvantagens como a imersão que leva à asfixia e a hiperhidricidade em explantes em culturas líquidas, e a elevação do custo e tempo de subcultivo em culturas gelificadas.

O uso de meio líquido para cultura *in vitro* tem muitos benefícios para a propagação massal, devido o maior contato do explante com a solução nutritiva (Teisson *et al.*, 1996). Hosoki & Asahira (1980) reportaram que o meio líquido foi melhor para a indução e a formação de brotos adventícios a partir de brotos laterais de três espécies de bromélia *Quesnelia quesneliana*, *Vriesea poelmanii* e *Aechmea fasciata*, quando utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com BAP (1,0mg/L) e ANA (1,0mg/L), observando-se a formação média de 8, 4 e 4 brotos adventícios, respectivamente.

Segundo Mercier & Kerbaudy (1997), os meios de cultura mais utilizados para o cultivo de bromélias são os sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e KC (Knudson, 1946). No entanto, Kukulczanka & Czastka (1989) repertam sucesso na utilização do meio RM para o cultivo de diversas espécies de bromélias. Sabe-se que o crescimento das bromélias é favorecido por altos níveis de fosfato no meio de cultura (Mercier & Kerbaudy, 1992). Sendo assim, para alguns casos, o meio KC é mais recomendado, pelo fato de conter 1,5 e 3,0 vezes mais fosfato que os meios MS e MS/2, respectivamente.

Em nosso laboratório utilizava-se até então apenas o meio MS ou MS/2 para a micropropagação de bromeliáceas (Alves, 2000; Feuser, 2000). Entretanto, estudos estão sendo conduzidos para se chegar a um meio de cultura, que seja eficiente e econômico (Dal Vesco, L.L. – contato pessoal – dados não publicados).

No presente trabalho foram estudados as condições indutivas da morfogênese *in vitro*, com ênfase à organogênese direta. Para tanto, duas vias foram testadas: indução *in vitro* de brotações laterais diretamente de sementes germinadas ou após o prévio crescimento *in vitro* dessas plântulas.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Indução de brotações diretamente das sementes

As sementes de *Dyckia distachya* foram gentilmente cedidas pelo Hortoflorestal da UHI (Itá – SC) e armazenadas sob refrigeração de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Anteriormente à desinfestação propriamente dita, as sementes passaram por um mergulho em água destilada, com a adição de cinco gotas de detergente comercial (louça), seguido por um triplo enxágue com água destilada. Sob CFL, as sementes foram mergulhadas em álcool 70% por três minutos, seguida por um mergulho em 5% de NaOCl por 30 minutos e por cinco enxágues com água esterilizada, conforme descrito por Mercier & Kerbaux (1993).

Após a desinfestação, as sementes, com sua parte alada removida, foram introduzidas em placas de Petri contendo 30mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e gelificadas com ágar 0,6% onde foram inoculadas 10 sementes por placa.

Para se avaliar qual a melhor concentração a ser usada para a obtenção de boas taxas de multiplicação *in vitro*, primeiramente foram testados oito tratamentos com BAP e Kin (0; 1,0; 2,5; 5 e $10\mu\text{M}$). Com a análise dos dados, observou-se uma curva de crescimento logarítmica, sem um ponto máximo (Pompelli *et al.*, 2001). Sendo assim, mais 10 tratamentos com BAP e Kin (0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e $30,0\mu\text{M}$) foram testados.

Cada tratamento consistiu de três repetições com quatro placas cada, arranjadas em DCC completamente casualizado. Aos 60 dias as plântulas que germinaram foram pesadas e re-inoculadas em frascos de 250mL com 25mL do mesmo meio de cultura acima, em fase líquida. Passados mais 60 dias, as brotações foram pesadas, contadas as formações laterais, com a finalidade de estipular seu incremento de peso fresco, bem como o número de brotações por explante e por grama de inócuo.

Os valores de peso fresco foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o número de brotações totais em $\log(x+1)$ e submetidos a análise de variância e teste de separação de médias (SNK $p \leq 0,05$).

As brotações laterais foram alongadas em MS/0 ou, quando necessário, na presença de AG₃ (10 μ M) até atingirem tamanho mínimo de 1,5cm de roseta para serem aclimatizadas. O plantio se deu em bandejas alveoladas com uma mistura de xaxim:vermiculita:areia (2:2:1) e aclimatização em túnel de aclimatização, com redução de 50% da intensidade luminosa.

2.2. Indução de brotações após o desenvolvimento de plântulas

Sementes foram coletadas, armazenadas e desinfestadas conforme descrito anteriormente. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 30mL de meio de cultura KC (Knudson, 1946), adicionado de Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e gelificadas com ágar 1,0% onde foram inoculadas 10 sementes por placa. Após a germinação, as plântulas resultantes foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (100 x 15mm) contendo o mesmo meio da fase de germinação, onde permaneceram até atingirem um tamanho mínimo de 1,5cm de roseta, onde então puderam ser usadas neste experimento.

Estas plântulas foram então segmentadas pela retirada do seu sistema radicular e inoculadas em frascos de 250mL com 30mL de meio de cultura. Foram testados 11 tratamentos, com a combinação de três fitorreguladores (ANA, BAP e PBZ) em dois suportes (líquido e gelificado), mais dois tratamentos isentos de fitorreguladores, MS/0 (líquido e gelificado). O meio de cultura usado nesta fase baseou-se nos sais orgânicos e inorgânicos de MS (Murashige e Skoog, 1962),

adicionados de sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), gelificadas ou não com ágar 0,6%. Os tratamentos usados foram ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M), ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (3 μ M), ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (6 μ M) e PBZ (5 μ M) combinados na forma líquida ou gelificada com ágar 0,6%. Adicionalmente, testou-se mais três tratamentos onde a concentração dos fitorreguladores foi reduzida à metade, ou seja, ANA (1 μ M) + BAP (1 μ M), ANA (1 μ M) + BAP (2 μ M) e ANA (1 μ M) + BAP (1 μ M) + PBZ (3 μ M), todos em fase líquida.

Cada tratamento consistiu de três repetições com quatro frascos ou placas cada, arranjados em DCC completamente casualizado. Realizou-se repicagens consecutivas a cada 30 dias aproximadamente, com a finalidade de se estipular a taxa média de regeneração ao longo dos subcultivos.

Os valores de peso fresco foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o número de brotações totais em $\log(x+2)$ e submetidos a análise de variância e teste de separação de médias (SNK $p \leq 0,05$).

As brotações laterais foram alongadas em MS/0 ou, quando necessário, na presença de AG₃ (10 μ M) até atingirem tamanho mínimo de 1,5cm de roseta para serem aclimatizadas.

2.2.1. Transferência *ex vitro* e aclimatização

Para o estudo da aclimatização sem o processo de enraizamento (descrito no capítulo IV), as plântulas micropropagadas foram transferidas diretamente para bandejas alveoladas com uma mistura de xaxim:vermiculita:areia (2:2:1) e crescidas em casa de vegetação com 50% de redução de luminosidade.

Anteriormente ao plantio, os plântulas foram avaliados pela presença e ausência de raízes formadas *in vitro*, sendo então arranjadas em três classes, conforme o tamanho: <1,5cm; 1,5-3,0cm e >3,0cm. Após 15, 30 e 60 dias, 30 plantas de cada classe foram retiradas do substrato e lavadas em água corrente, sendo que suas raízes, quando presentes, foram avaliadas sob os seguintes parâmetros: continuam sem raiz, morte das plantas, desenvolvimento ou morte das raízes já pré-existentes, nascimento de novas raízes. Os dados apresentam-se expostos na Figura 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução de brotações diretamente das sementes

Para efeito de padronização das nomenclaturas, utilizou-se aqui as seguintes: broto = resultado da neo-formação *in vitro*, com o uso dos fitorreguladores; plântula = brotação com total aparência de uma planta, porém ainda *in vitro* e plânta = plântula que após alongada e enraizada, foi transplantada para as condições *ex vitro* onde se deu a aclimatização.

Os primeiros primórdios foliares começaram a surgir três dias após a inoculação, sendo que aos 30 dias todas as sementes viáveis já tinham germinado (Figura 10-A). Aos sessenta dias de cultura, os explantes que germinaram foram pesados e re-inoculados nos mesmos meios da fase de germinação, porém em fase líquida (Figura 10-C). Na ocasião, percebeu-se que em alguns frascos já havia boa formação de brotações laterais, como esquematizado na Figura 10-B.

Fischer & Zimmer (1988) descrevem que sementes de bromélias, quando germinadas em meio de cultura na presença de citocininas podem originar mais de uma brotação por semente, sendo que a primeira é considerada principal, e as demais secundárias ou laterais.

No primeiro experimento realizado (Pompelli *et al.*, 2001), quando concentrações de 1,25 a 10 μ M foram usadas tanto para BAP quanto para Kin, percebeu-se com as análises de regressão uma linha logarítmica, sem um ponto máximo, indicando que estudos complementares deveriam ser realizados para essa espécie. Sendo assim, os estudos foram prosseguidos, com o objetivo de se ampliar a faixa das concentrações dos fitorreguladores para que se pudesse verificar o efeito dessas concentrações sobre a taxa de regeneração.

No segundo experimento, concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 μ M foram usadas para ambos os fitorreguladores, sendo que os dados obtidos nesse experimento foram semelhantes aos dados obtidos anteriormente para as concentrações de 5 e 10 μ M. Sendo assim, e para que se pudesse visualizar melhor os dados, preferiu-se juntar os dois experimentos em um só, já que todas as condições estabelecidas em um eram exatamente as mesmas estabelecidas noutro.

Portanto, com a interpolação dos dados, obtidos pela análise da regressão (Figura 1), verifica-se que para o fator brotos por grama, a concentração de

20 μ M foi a limiar superior tanto para BAP quanto para Kin, sendo que a concentração de 30 μ M mostrou efeito fitotóxico, fazendo com que a taxa de regeneração caísse. BAP não mostrou diferença estatística ($p \leq 0,05$) para as concentrações de 15, 20 e 30 μ M. Entretanto a concentração de 20 μ M induziu 78,93 brotações por grama de inócuo. Já, para a citocinina Kin, os valores foram mais homogêneos, não sendo possível a obtenção de diferenças estatísticas entre as principais concentrações. No entanto, o nível de 20 μ M induziu 26,23 brotações por grama de inóculo (Tabela 1). Fato semelhante foi relatado na micropropagação de *Centella asiatica* (Tiwari *et al.*, 2000), onde as melhores taxas de micropropagação foram obtidas com a utilização de 22 μ M de BAP, sendo que valores muito inferiores foram obtidos com o dobro da concentração.

Quando a análise foi feita entre os fitorreguladores percebeu-se uma sensível diferença entre BAP e Kin. Enquanto o primeiro promoveu a indução de 64,30 brotações por grama, o segundo induziu apenas 17,14 brotações por grama de inócuo (Tabela 1).

Com a análise de regressão para o fator brotos por explante (Figura 2), observou-se dois picos máximos – um verificado no nível de 5 μ M e o outro em torno de 25 μ M. Com as análises de regressão, deduziu-se que a melhor curva era a de ordem 4, pois era a que melhor se adequava aos dados apresentados.

Os dados de brotos por explante, ao contrário do fator brotos por grama, os quais seguiram a curva com tendência normal, tiveram resultados bem variados. Assim, para BAP a melhor concentração foi a de 1 μ M, com uma média de regeneração de 20,30 brotos por explante, em 120 dias de cultivo. No entanto para Kin os melhores resultados foram obtidos com o nível de 2,5 μ M dessa citocinina, a qual proporcionou uma taxa de 7,11 brotações por explante. Os valores apresentados para BAP são maiores do que os valores de 15,2 brotos alcançados por Mercier & Kerbauy (1992) quando da multiplicação de *Vriesea fosteriana* em um sistema semelhante ao descrito aqui, porém com a utilização de 2,7 μ M de ANA + 8,9 μ M de BAP.

Quando se analisa o efeito fitorregulador utilizado, novamente percebeu-se que BAP foi superior ao Kin, induzindo uma média de 12,07 brotações

por explante, enquanto na presença de Kin, 4,41 brotações por explante foram formadas em 120 dias de cultivo.

O efeito incremento de peso refere-se ao ganho de massa que os explantes conseguem acumular durante o cultivo. Em teoria o explante usa suas reservas para crescer em tamanho e conseqüentemente em massa, e quando da multiplicação, reduziria seu crescimento e usaria essas reservas para o desenvolvimento de novos brotos. Sendo assim, quanto mais o explante cresce, menos brotações originaria. Entretanto, em *Dyckia distachya* esse efeito não foi percebido, evidenciando que esses dois processos seriam independentes, ou como relatado por Alves (2000), são dependentes de um fator endógeno a ser expresso em determinados explantes.

Skoog & Muller (1965) postularam que as citocininas geralmente regenerariam brotações enquanto que as auxinas estimulariam os explantes ao retorno das divisões celulares dando origem à formação de calos ou raízes. No entanto, vários trabalhos relatam que as citocininas, quanto usadas isoladamente são ineficientes para a regeneração de brotações, e quando isso é possível, baixas taxas de regeneração são mostradas (Tiwari *et al.*, 2000; Carneiro *et al.*, 1999; Sudha & Seeni, 1996; Hosoki & Asahira, 1980).

Diversas citocininas são usadas para indução organogênética, entre elas pode-se citar: BAP, Kin, 2-iP, TDZ entre outros. Sarma & Rogers (2000) testaram as citocininas BAP, Kin e 2-iP na micropropagação de *Juncus effusus*. Nesse trabalho observou-se que tanto BAP quanto 2-iP eram mais efetivos na proliferação de brotos, e que Kin induzia as mais baixas taxas de multiplicação; mostraram ainda que o 2-iP era a citocinina mais promissora, sendo capaz de induzir, em média, 10 brotos por explante. Resultados semelhantes foram descritos por Sudha & Seeni (1996) quando da micropropagação de *Rauwolfia micrantha*.

Apesar dos bons resultados mostrados no presente trabalho para o BAP, Tornero *et al.* (2000) descreveram que o TDZ, uma feniluréia substituída, mostrou efeitos superiores na micropropagação de damasco. No entanto, essa citocinina foi menos efetiva do que BAP na multiplicação de *Cryptanthus sinuosus*, uma bromélia ameaçada de extinção (Carneiro *et al.*, 1998).

Como já descrito no presente trabalho, aos 60 dias em meio de cultura gelificado, alguns explantes mostraram início de brotações secundárias. No entanto, quando estes foram transferidos para o meio líquido, as brotações se tornaram aparentes em todos os tratamentos. Fato semelhante foi relatado em *Vriesea fosteriana*, onde o número de brotações dobrou com uma segunda repicagem para um meio de cultura líquido (Mercier & Kerbauy, 1992)

No presente trabalho mostrou-se que a citocinina BAP foi mais promissora que o Kin na formação de brotações laterais, como já descrito por Hu & Vang (1983), os quais afirmaram que o BAP é efetivo na formação de um grande número de brotos e na obtenção de uma alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação. Isto poderia ser atribuído a uma melhor saturação dos receptores de membrana pela citocinina BAP (Taiz & Zeiger, 1998).

Tabela 1 – Características de *Dyckia distachya*, cultivada *in vitro*, em resposta aos fitorreguladores BAP e Kin, suplementados ao meio de cultura, após 120 dias de cultivo. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (SNK $p \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Meio de Cultura	Peso (g)		Brotos (N.º) Final	Incremento de peso (x)*	Brotos por Grama	Brotos por Explante
	Inicial	Final				
MS/0	0,13	1,03	3,67	7,88	3,54 c	1,22 c
BAP (1µM)	0,09	1,71	60,89	19,73	44,57 ab	20,30 a
BAP (2,5µM)	0,09	1,41	58,73	14,74	41,10 ab	19,58 a
BAP (5µM)	0,04	0,64	32,50	16,59	64,74 ab	11,57 ab
BAP (10µM)	0,05	0,75	37,72	13,97	66,16ab	10,76 ab
BAP (15µM)	0,02	0,21	14,67	10,21	76,17 ^a	6,19 abc
BAP (20µM)	0,02	0,34	25,00	15,85	78,93 a	10,89 ab
BAP (30µM)	0,03	0,31	24,33	10,44	76,16 a	7,06 ab
X BAP			36,26	14,50	64,30 A	12,07 A
MS/0	0,13	1,03	3,67	7,88	3,54 c	1,22 c
Kin (1µM)	0,24	1,67	13,72	6,91	5,76 c	4,57 bc
Kin (2,5µM)	0,17	1,41	21,33	8,42	15,00 bc	7,11 ab
Kin (5µM)	0,11	0,71	11,17	6,31	15,33 bc	3,80 bc
Kin (10µM)	0,10	0,72	14,28	6,98	19,60 bc	5,12 bc
Kin (15µM)	0,04	0,42	6,89	9,31	20,23 bc	2,94 bc
Kin (20µM)	0,05	0,32	9,72	6,82	26,23 bc	4,57 bc
Kin (30µM)	0,06	0,64	11,55	10,10	17,13 bc	2,70 bc
X Kin			12,67	7,84	17,14 B	4,41 B
Média Geral			24,46	11,17	40,72	8,24
		CV (%)			16,76	25,74

* Quociente entre o peso final e o peso inicial. Letras minúsculas entre os tratamentos e maiúscula entre os fitorreguladores.

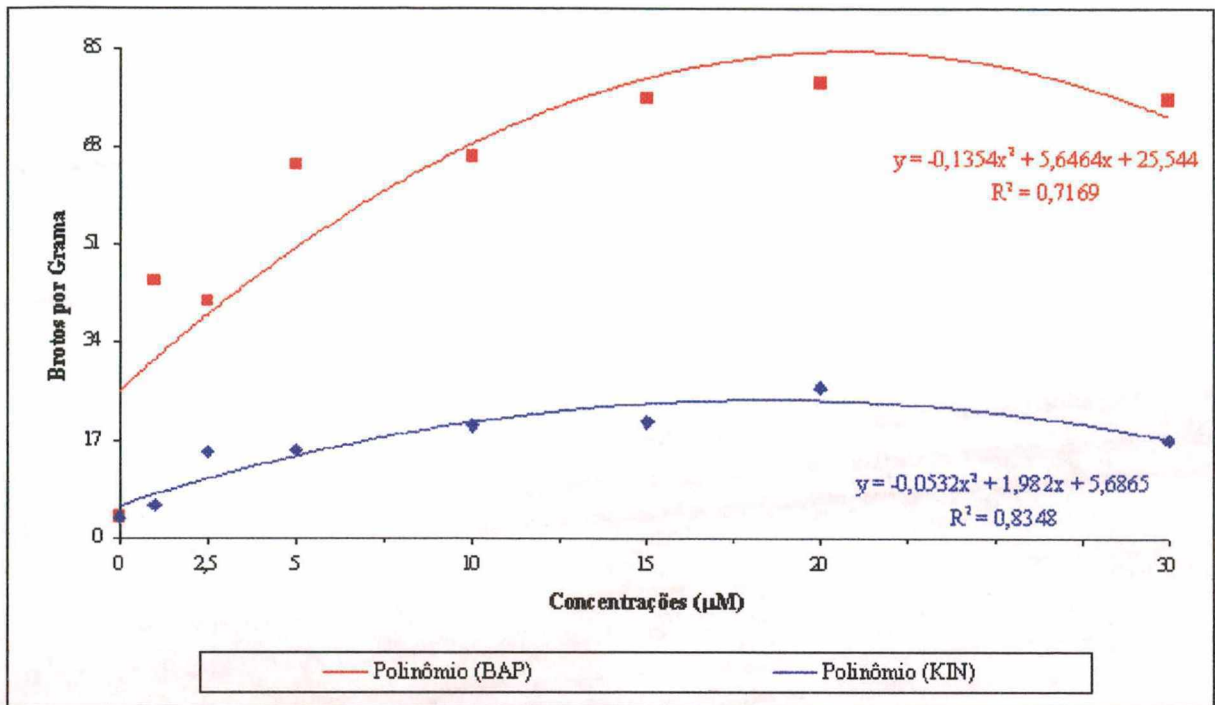


Figura 1 – Curva de regressão para a taxa de regeneração de brotos por grama em culturas *in vitro* de *Dyckia distachya* em respostas a diferentes níveis de BAP e Kin, 120 dias após o cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

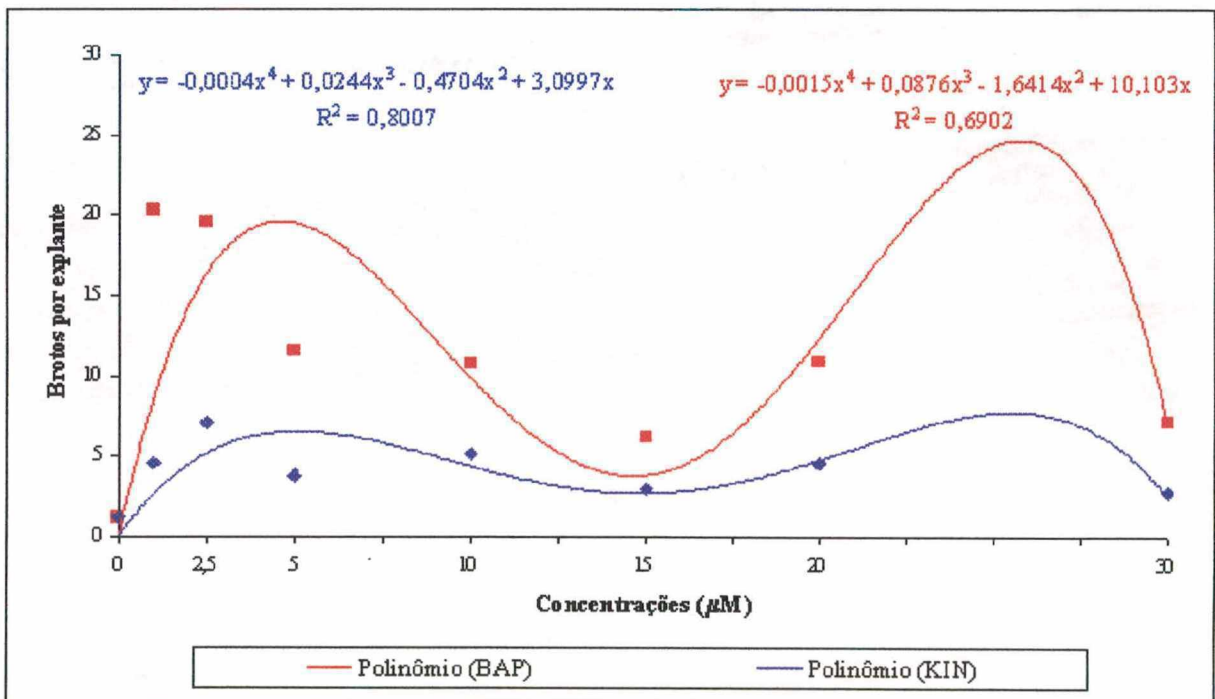


Figura 2 – Curva de regressão para a taxa de regeneração de brotos por explante em culturas *in vitro* de *Dyckia distachya* em respostas a diferentes níveis de BAP e Kin, 120 dias após o cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

3.2. Indução de brotações após o desenvolvimento das plântulas

Após três dias em cultura, os primeiros primórdios folhares já podiam ser observados nas sementes em germinação, e após um período de aproximadamente 30 dias em cultura todas as sementes viáveis já tinham germinado, com bom desenvolvimento de parte aérea e radicular (Figura 11-A). Passado esse tempo, as plântulas foram subcultivadas individualmente em tubos de ensaio, contendo 5mL de meio de cultura KC (o mesmo da fase de germinação), onde permaneceram até atingirem um tamanho mínimo de 1,5cm (Figura 11-B), o que aconteceu em torno de 60 dias. Somente plântulas $\geq 1,5$ cm de diâmetro de roseta folhar foram usadas como explantes.

A segmentação das plântulas, com a retirada do seu sistema radicular, se deu devido ao fato observado preliminarmente (dados não publicados), que na ausência do sistema radicular estas se desenvolviam melhor, originando mais brotações.

As plântulas, ao serem inoculadas nos frascos com os devidos tratamentos, mostraram os primeiros sinais de brotações laterais após 30 dias.

Para o fator brotos por explante observou-se que o meio de cultura líquido suplementado com ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ ($6\mu\text{M}$) mostrou-se sempre superior. Esse tratamento induziu 21,31; 80,96; 121,93 e 133,58 brotações por explante aos 45, 75, 112 e 142 dias, respectivamente. Os dados encontram-se expostos na Tabela 2 e Figura 3, sendo que nesta, evidencia-se o comportamento de todos os tratamentos ao longo dos subcultivos.

Já para o fator brotos por grama os dados foram mais homogêneos. A melhor taxa de multiplicação alcançada foi de 72,94 brotos por grama na presença de ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP (μM) + PBZ ($6\mu\text{M}$) em meio gelificado aos 112 dias de cultivo, sendo esse valor estatisticamente diferente dos demais tratamentos (SNK $p \leq 0,05$) (Tabela 3 e Figura 4).

Se analisarmos as recentes publicações sobre micropropagação de bromélias conclui-se que, no presente trabalho, as taxas de multiplicação foram altas. Para *Aechmea fasciata* (Vinterhalter & Vinterhalter, 1994), a melhor taxa de multiplicação foi de 4,53 brotos por explante na presença de 2,0mg/L de Kin + 2,0mg/L de AIA. Resultados semelhantes foram relatados por Hosoki & Asahira

(1980) para a multiplicação de *Vriesea poelmanii*, *Aechmea fasciata* e *Quesnelia quesneliana* onde 4, 4 e 8 brotos adventícios foram induzidos, respectivamente, em cada broto lateral na presença de 1,0mg/L de ANA e BAP. Dal Vesco *et al.* (2001b) na multiplicação de *A. fasciata* obtiveram uma taxa de multiplicação de 11,9 brotos por explante na presença de ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M). Já para abacaxi var. Pérola (Dal Vesco *et al.*, 2001a) a maior taxa de multiplicação foi de 13,5 brotos por explante na presença de ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M). Índices semelhantes foram relatados para *Tillandsia cyanea* (Pierik & Sprenkels, 1991), onde 14,6 brotos foram conseguidos após 10 semanas de cultivo, em meio de cultura suplementado com 0,2mg/L de BAP. Entretanto, para *V. fosteriana* cultivada em meio KC, suplementado com 2,7 μ M de ANA e 8,9 μ M de BAP, a melhor taxa de indução foi de 22,5 brotos por explante (Mercier & Kerbauy, 1992). As maiores taxas de multiplicação revisadas na literatura, referem-se a micropropagação de *Neoregelia cruenta*, com uma taxa de multiplicação de 50,3 brotos por explante com a utilização de explantes foliares excisados de cultura asséptica, na presença de 22 μ M de BAP + 2,5 μ M de ANA, após sete semanas de cultivo (Carneiro *et al.*, 1999). Na literatura revisada, apenas um trabalho com uma espécie do gênero *Dyckia* foi encontrado, onde *Dyckia macedoi* mostrou uma taxa de multiplicação de 9 brotos por explante na presença de 0,1mg/L de ANA + 5,0mg/L de BAP (Mercier & Kerbauy, 1993).

Quando se avaliou os tratamentos empregados no presente trabalho, sem levarmos em conta os subcultivos, percebeu-se que, no fator brotos por explante, o meio de cultura suplementado com ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (6 μ M) em fase líquida, mostrou-se novamente superior aos demais tratamentos, com uma média de 89,44 brotos por explante. Entretanto no fator brotos por grama, os meios de cultura gelificados, suplementados com ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (3 e 6 μ M) induziram uma média de 51,86 e 56,88 brotos por grama de inóculo, respectivamente; valores esses que não diferiram (SNK $p \leq 0,05$) do tratamento com A₂B₄ + PBZ (6 μ M) em meio líquido, com 45,54 brotos por grama de inóculo, porém diferindo-se dos demais tratamentos.

Os dados referentes as médias dos tratamentos encontram-se nas Tabelas 2 e 3 e nas Figuras 5 e 6. Para uma melhor interpretação do efeito dos

subcultivos, os tratamentos que possuíam valores acima de um terço do valor máximo encontrado foram selecionados para uma análise mais pormenorizada do efeito dos subcultivos nos devidos tratamentos. Percebe-se nas figuras 5 e 6 uma linha pontilhada, a qual destaca o limite de 1/3 a ser usado. Sendo assim, para o efeito brotos por explante, foram selecionados seis tratamentos: ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) (líquido), ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ (3 e $6\mu\text{M}$) (líquido e gelificado) e ANA ($1\mu\text{M}$) + BAP ($1\mu\text{M}$) + PBZ ($3\mu\text{M}$) (líquido). Enquanto para o efeito brotos por grama foram selecionados sete tratamentos: ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) (líquido e gelificado), ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ (3 e $6\mu\text{M}$) (líquido e gelificado) e ANA ($1\mu\text{M}$) + BAP ($1\mu\text{M}$) + PBZ ($3\mu\text{M}$) (líquido).

Pode-se evidenciar na Figura 7 a eficiência do tratamento com ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ ($6\mu\text{M}$) em fase líquida. Percebe-se também que a utilização de quatro subcultivos não foi suficiente para evidenciar um valor máximo, com posterior queda na produção de brotos por explante. No entanto, a Figura 8 mostra que, em praticamente todos os tratamentos selecionados a maior taxa de multiplicação se deu no terceiro subcultivo, sendo essa taxa diminuída no quarto subcultivo. Ainda nesta figura percebe-se que o tratamento composto por ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ ($6\mu\text{M}$) em fase gelificada induziu uma média de 72,94 brotações por grama na terceira repicagem, valor este não estatisticamente diferente (SNK $p\leq 0,05$) do tratamento composto por ANA ($2\mu\text{M}$) + BAP ($4\mu\text{M}$) + PBZ ($3\mu\text{M}$) em fase gelificada com 70,76 brotos por grama na quarta repicagem.

Quatro subcultivos não foram suficientes para mostrar o efeito máximo na produção de brotos por explante, mesmo assim as repicagens foram suspensas devido a forte presença de brotos com aspectos hiperhídricos (Figuras 11-H e I). Plantas hiperhídricas, também conhecidas como vitrificadas, caracterizam-se pela formação de caules curtos, delgados e translúcidos, com entrenós reduzidos, e de folhas com parênquima lacunoso hipertrofiado. As células dos tecidos hiperhídricos sofrem alterações com redução do citoplasma acompanhada do aumento do volume de água, em decorrência do enfraquecimento das paredes celulares (Kevers *et al.*, 1988). A baixa taxa fotossintética, determinada pela redução do tecido paliçádico e da quantidade de clorofila, constitui um dos principais fatores responsáveis pelo aspecto

translúcido das plantas hiperídricas (Ziv, 1991). Os brotos hiperhídricos mostram redução da dominância apical, hipertrofia e defeito na parede celular (Jain *et al.*, 2001). Para Nobre *et al.* (1996), o aumento da concentração de citocininas pode levar à hiperhidricidade dos brotos durante a propagação vegetativa *in vitro*, sendo esse efeito um fator limitante para a propagação *in vitro*. A hiperhidricidade registrada neste trabalho, já foi documentada para outras espécies, tais como *Vriesea friburgensis* (Alves & Guerra, 2001b) e *Fragaria x ananassa* (López-Aranda *et al.*, 1994).

Não obstante, segundo Vinterhalter & Vinterhalter (1994), a frequência de aparecimento de plantas com aberrações está associada com o número de subcultivos e o tempo no qual as culturas permanecem em condições *in vitro*. No tocante ao número de subcultivos, *V. platynema* apresentou uma redução na taxa proliferativa na segunda repicagem em relação a primeira (Mette *et al.*, 2001). Essa redução, segundo Debiasi (2000), provavelmente deve-se à diminuição do potencial regenerativo dos brotos, dado à perda de sensibilidade do tecido em responder aos fitorreguladores. Em *Fragaria x ananassa* a proliferação também diminuiu nitidamente após cinco subcultivos (López-Aranda *et al.*, 1994), fato que também foi observado no quarto para o terceiro subcultivo no presente trabalho, em relação ao fator brotos por grama.

Quando se avaliou os suportes utilizados (líquido e gelificado), percebe-se que para o fator brotos por explante o meio de cultura líquido mostrou-se mais eficiente em todos os subcultivos (Tabela 2). Entretanto, para o fator brotos por grama o efeito demonstrado foi contrário. Taxas de regeneração superiores foram observadas quando o meio de cultura foi gelificado com ágar. Porém, quando analisada a média geral, os suportes líquido e gelificado não foram estatisticamente diferentes entre si.

Segundo Carneiro *et al.* (1999), a cultura líquida previne a oxidação dos explantes e pode ser uma boa alternativa para induzir a regeneração de explantes de *Neoregelia cruenta*. Hosoki & Asahira (1980) concordam e afirmam que os brotos laterais cultivados em meio líquido crescem mais rápido do que os cultivados em meio sólido; efeito devidamente explicado, visto o fato de que bromélias absorvem nutrientes não somente pelas raízes mas também pelas folhas. Por essa razão, o

crescimento ótimo em meio de cultura líquido pode ser devido a facilidade de absorção de nutrientes pelas folhas ou pelo explante inteiro.

Em contraste a estes, Mercier & Kerbauy (1992) mostraram que o meio de cultura KC gelificado foi melhor para a germinação de *V. fosteriana*, já que em meio líquido, as mudas mostraram um decréscimo do vigor e posteriormente morte.

Em geral, os valores apresentados neste trabalho mostram uma ligeira superioridade quando os brotos são cultivados em meio líquido. Sendo assim recomenda-se a utilização do meio de cultura em fase líquida devido ao já exposto por outros autores e também quanto ao fator custo, pois os agentes gelificantes encarecem o processo de micropropagação, sendo este um dos reagentes mais onerosos nos protocolos de multiplicação de espécies *in vitro* (Lima *et al.*, 2001; Aitken-Christie, 1991).

Outras observações fenotípicas também foram realizadas durante as repicagens. Nos tratamentos suplementados com PBZ observou-se a formação de raízes, as quais se mostraram grossas e curtas, diferentes das formadas na ausência de fitorreguladores, as quais eram finas e longas. Não obstante, as plântulas inoculadas na presença desse fitorregulador mostraram efeitos fitotóxicos, com amarelamento das pontas das folhas, acarretando algumas vezes na morte da planta ou então a morte das folhas externas, restando apenas a parte central dos explantes, como evidenciado na Figura 11-G.

Apesar disso, o paclobutrazol auxiliou no desenvolvimento de brotos com aparência normal nos tratamentos onde as concentrações de fitorreguladores foram reduzidas pela metade (A_1B_1 , A_1B_2 e $A_1B_1 + PBZ 3\mu M$). Quando os explantes foram inoculados na ausência de PBZ, os brotos formados apresentaram-se estiolados, sem a distinta formação de brotos, fato que dificultou muito a contagem dos mesmos (Figura 11-K). Efeito esse perfeitamente minimizado quando estes foram cultivados na presença de $3\mu M$ de PBZ (Figura 11-J).

3.2.1. Transferência *ex vitro* e aclimatização

Terminada as avaliações referentes aos processos de micropropagação, os brotos foram alongados em MS/0 até atingirem tamanho mínimo de 1,0cm de roseta folhar, sendo então transferidos para as condições *ex vitro*. Anteriormente a isso, as plântulas foram avaliadas quanto a presença ou ausência de raízes. Sendo assim, 16%, 20% e 40,54% das plântulas com tamanho <1,5cm, 1,5-3,0cm e >3,0cm respectivamente já possuíam raízes. O tamanho médio das raízes foi de 12,6mm, 11,3mm e 14,02mm respectivamente, antes do plantio.

Todos os fatores avaliados foram influenciados pelo tempo e pelo tamanho das plântulas micropropagadas (Tabela 4). Sendo assim os fatores crescimento e formação de novas raízes foram positivamente influenciados, mostrando valores quase sempre em ascensão, como esquematizado na Figura 9. Não obstante, os fatores morte das plantas, morte das raízes e plântula sem raiz foram negativamente influenciados, mostrando valores quase sempre em queda.

Alguns autores afirmam que as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, por lhes faltarem pêlos radiculares e conexão vascular e por não desenvolverem um câmbio secundário após o período em cultura (Borkowska, 2001). Sendo assim, após transferência *ex vitro*, geralmente morrem e novas raízes são formadas. Entretanto, como mostrado na Figura 9, a maioria das plantas, que já apresentavam raízes tiveram-as crescidas com valores variando entre 3,12% aos 15 dias e 28,20% aos 60 dias, sendo que poucas destas morreram (valores entre 0 e 8,33%).

Entretanto, a formação de novas raízes atingiu valores elevados podendo chegar a 57,14% das plantas avaliadas aos 60 dias para o tamanho de 1,5-3,0cm. Estes dados podem ser devidamente explicados, visto o fato que bromélias terrestres, como é o caso de *Dyckia distachya*, necessitam de raízes para se estabelecer completamente a campo. Na Figura 9 observa-se que a percentagem de morte das plantas foi, em alguns casos, alto, atingindo valores de até 25% das avaliações aos 15 dias para as plantas com tamanho inferior a 1,5cm. Essa mortalidade pode ser devida a dois fatores: ① por não possuírem raízes, as plantas não conseguindo extrair os nutrientes do solo acabaram morrendo e ② problemas técnicos ocorridos no sistema de nebulização do túnel de aclimatização nos primeiros dias da transferência.

Pode-se visualizar na Tabela 4 que mesmo após passados 60 dias da transferência, ainda assim 20% das plantas avaliadas com tamanho de 1,5-3,0cm não tinham formado raízes. Se a premissa levantada acima for verdadeira, então pode-se inferir que se estas plantas não formarem raízes nos próximos dias a mortandade poderá se elevar a valores muito acima dos já apresentados, o que inviabilizaria esse processo.

Ainda assim, pode-se inferir que a grande presença de raízes *in vitro* e posterior formação *ex vitro* pode ter sido favorecida pela utilização do fitorregulador paclobutrazol, quando do processo de micropropagação. Isso pode ser atribuído ao fato de que esse fitorregulador é considerado um inibidor da síntese de giberelinas e sendo assim, inibe o alongamento celular e promove o enraizamento (Department of Energy U.S., 2000; George, 1993). Esta observação é confirmada com a elaboração de um teste preliminar, onde brotos foram micropropagados sem a presença de PBZ e aclimatizados sem um processo de indução de raízes, ocorrendo por conseguinte uma grande mortandade das plântulas no processo de aclimatização.

Com isso pode-se concluir que, se as plântulas não forem induzidos a enraizarem, estes necessitam permanecer mais tempo em cultura *in vitro*, visto que plântulas maiores responderam melhor quando aclimatizadas.

Para minimizar este ocorrido recomenda-se que as plântulas micropropagados de *Dyckia distachya* passem por um processo de indução de raízes antes da transferência *ex vitro* e posterior aclimatização, como será apresentado no Capítulo IV.

Para finalizar, pode-se concluir que a grande vantagem desse sistema de cultura *in vitro* é o grande potencial regenerativo alcançado. Se considerarmos que para o processo de micropropagação na presença de BAP, utilizou-se 0,47 gramas de brotos, os quais, após 120 dias mostraram um incremento médio de 14,50x e que a média de formação de brotos foi de 64,35 brotos por grama, pode-se inferir que com a utilização de 1 grama de inócuo é possível se produzir 933 plantas em 120 dias (Tabela 1), como já estimado por Alves & Guerra (2001a). Não obstante se recordarmos uma média de 90% de sobrevivência das plantas sob condições *ex vitro* podemos produzir em torno de 840 plantas com apenas um ciclo de micropropagação após 120 dias de cultivo, seguidos de mais 120 dias de aclimatização.

Os coeficientes de variação dos experimentos mostram que houve um bom controle dos fatores, pois este valor ficou entre 7,56% e 25,74%, os quais podem ser considerados satisfatórios, quando verificamos que o material utilizado como explante era originado de diferentes genótipos, onde cada qual pode responder diferentemente aos reguladores de crescimento utilizados na cultura *in vitro* (George, 1993).

Segundo Carneiro *et al.* (1999) e Malda *et al.* (1999), sementes, mudas e material vegetativo podem ser coletados de forma não destrutiva na natureza, e sendo assim podem contemplar de uma boa variabilidade genética, a qual pode então ser usada nos processos de micropropagação. Sendo assim, e devido ao fato das plantas terem sido produzidas através da germinação de sementes, esse protocolo permite manter a diversidade genética das populações originais, com impactos positivos sobre a conservação.

Tabela 2 = Número médio de Brotos por explante de *Dyckia distachya*, cultivadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificados ou não com ágar (0,6%) ao longo dos subcultivos. Médias seguidas por letras minúsculas entre os tratamentos e de letras maiúsculas entre os suportes (líquido e gelificado). Médias expressas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Meio de Cultura	Brotos por explante nos subcultivos				Total Subcultivos
	45 dias	75 dias	112 dias	142 dias	
MS/0	0,25 c	0,36 g	2,33 e	2,67 d	1,40 e
A ₁ B ₁	5,51 b	12,10 d	40,99 bc	61,04 ab	29,91 c
A ₁ B ₂	4,56 b	14,87 d	37,55 bc	53,69 ab	27,67 c
A ₂ B ₄	11,36 b	33,56 bc	57,66 ab	68,65 ab	42,81 bc
A ₁ B ₁ + PBZ (3 μ M)	8,08 b	25,22 c	60,34 ab	90,62 ab	46,07 bc
A ₂ B ₄ + PBZ (3 μ M)	10,68 b	45,21 b	84,94 ab	99,13 ab	59,99 b
A ₂ B ₄ + PBZ (6 μ M)	21,31 a	80,96 a	121,93 a	133,58 a	89,44 a
PBZ (5 μ M)	1,78 c	5,97 e	9,45 d	15,21 c	8,10 d
X Líquido	7,94 A	27,28 A	51,90 A	65,57 A	38,17 A
MS/0	0,14 c	0,14 g	0,00 f	0,00 d	0,07 e
A ₂ B ₄	6,84 b	16,19 d	22,48 c	35,96 b	20,37 c
A ₂ B ₄ +PBZ (3 μ M)	8,69 b	29,89 bc	46,06 bc	71,35 ab	39,00 bc
A ₂ B ₄ +PBZ (6 μ M)	10,69 b	32,00 bc	55,44 ab	78,96 ab	44,27 bc
PBZ (5 μ M)	0,37 c	2,50 f	9,36 d	11,18 c	5,85 d
X Gelificado	5,35 A	26,14 A	26,67 B	39,49 A	21,91 A
C V (%)	14,49	7,56	10,61	12,32	11,19
M É D I A G E R A L = 3 1 , 9 2					

* Na linha entre os subcultivos e na coluna entre os tratamentos em cada subcultivo

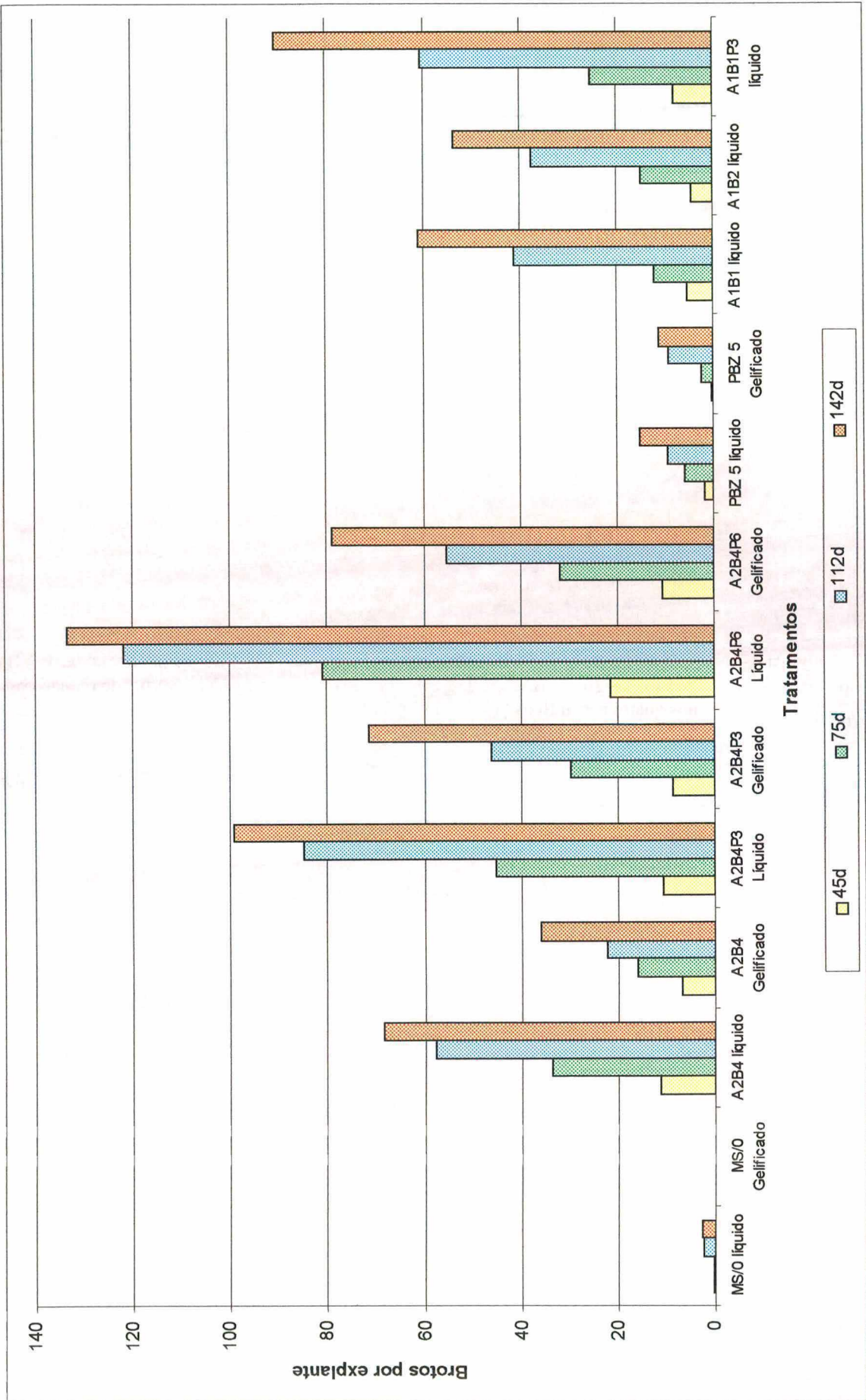
Tabela 3 = Número médio de brotos por grama de *Dyckia distachya*, cultivados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificado ou não com ágar (0,6%) ao longo dos subcultivos. Médias seguidas por letras minúsculas entre os tratamentos e de letras maiúsculas entre os suportes (líquido e gelificado). Médias expressas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

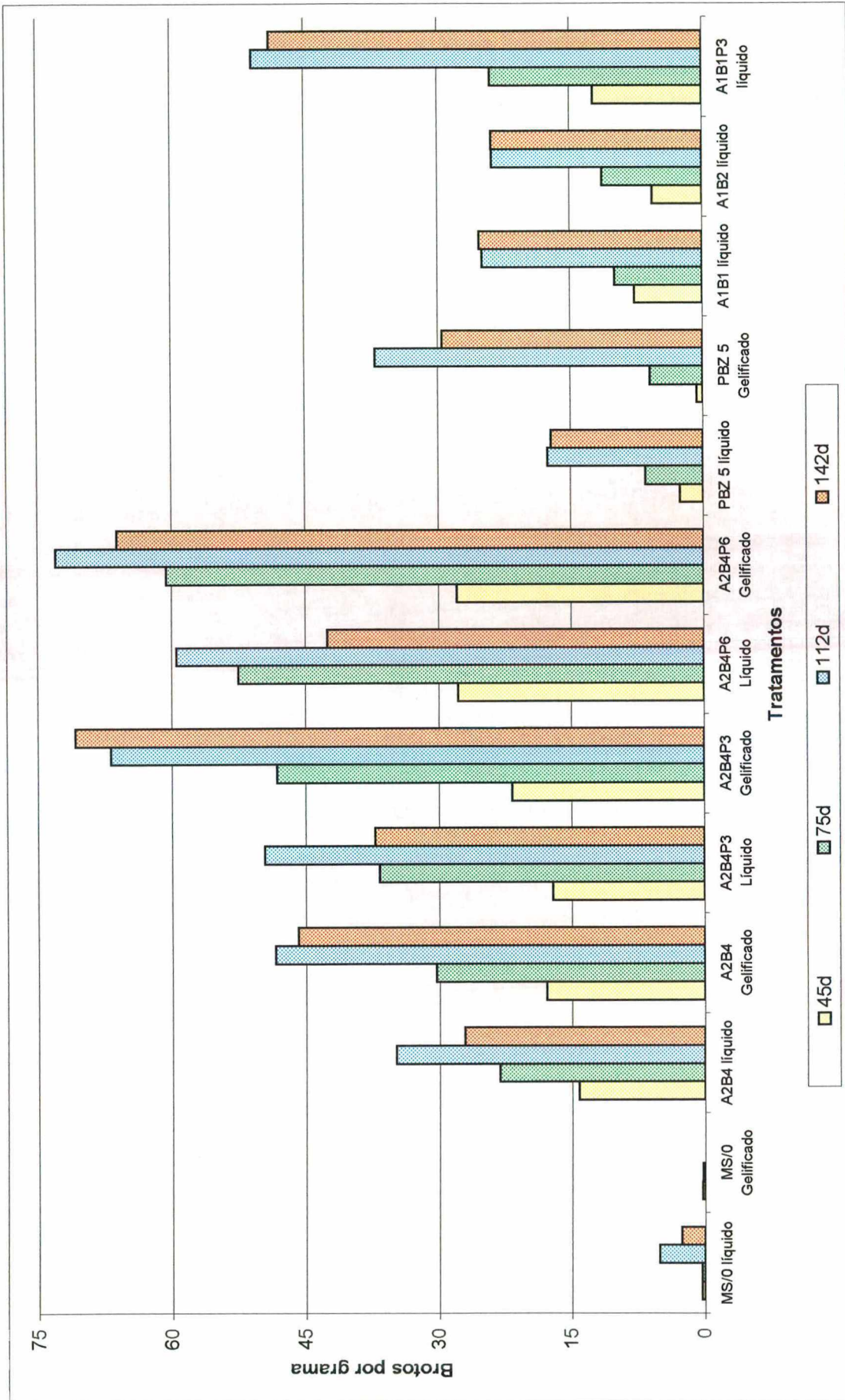
Meio de Cultura	Brotos por grama nos subcultivos				Total Subcultivos
	45 dias	75 dias	112 dias	142 dias	
MS/0	0,31 f	0,31 e	5,15 g	2,60 e	2,09 ef
A ₁ B ₁	7,68 bc	9,94 de	24,89 ef	25,22 cd	16,93 de
A ₁ B ₂	5,60 cd	11,35 de	23,79 ef	23,86 cd	16,15 de
A ₂ B ₄	14,22 abc	23,15 cd	34,84 e	27,15 cd	24,84 cd
A ₁ B ₁ + PBZ (3 μ M)	12,34 abc	23,97 cd	50,84 cd	48,85 b	34,00 bc
A ₂ B ₄ + PBZ (3 μ M)	17,12 ab	36,65 bc	49,56 cd	37,21 bc	35,14 bc
A ₂ B ₄ + PBZ (6 μ M)	27,79 a	52,49 a	59,41 bc	42,48 b	45,54 ab
PBZ (5 μ M)	2,60 de	6,51 e	17,57 f	17,20 d	10,97 def
X Líquido	10,96 A	20,55 A	33,26 B	28,07 B	23,21 A
MS/0	0,28 f	0,23 e	0,00 g	0,00 e	0,13 f
A ₂ B ₄	17,84 ab	30,28 c	48,44 cd	45,87 b	35,61 bc
A ₂ B ₄ + PBZ (3 μ M)	21,69 a	48,20 ab	66,80 ab	70,76 a	51,86 a
A ₂ B ₄ + PBZ (6 μ M)	27,93 a	60,57 a	72,94 a	66,07 a	56,88 a
PBZ (5 μ M)	0,67 ef	5,98 e	37,03 de	29,48 cd	18,29 d
X Gelificado	13,68 A	29,05 A	45,04 A	42,43 A	32,55 A
C V (%)	19,94	8,17	10,69	11,04	16,72
M É D I A G E R A L = 2 6 , 8 0					

* Na linha entre os subcultivos e na coluna entre os tratamentos em cada subcultivo

Tabela 4 = Percentagem de formação de raízes em plântulas micropropagadas de *Dyckia distachya* após transferência para as condições *ex vitro*, em função do tempo (após 15, 30 e 60 dias) sem indução de raízes. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Observação	15 dias			30 dias			60 dias		
	<1,5	1,5-3,0	>3,0	<1,5	1,5-3,0	>3,0	<1,5	1,5-3,0	>3,0
Continuam sem raiz	56,25	45,16	31,25	36,11	38,89	30,00	19,51	20,00	10,26
Morte das plantas	25,00	12,90	6,25	8,33	8,33	7,50	7,32	5,71	0,00
Crescimento das raízes	3,12	22,58	21,88	13,89	13,89	22,50	14,63	11,43	28,20
Morte das raízes	6,25	0,00	9,37	8,33	2,78	0,00	4,88	5,72	5,13
Nasc. de novas raízes	9,38	19,36	31,25	33,34	36,11	40,00	53,66	57,14	56,41
Total Geral	100%								





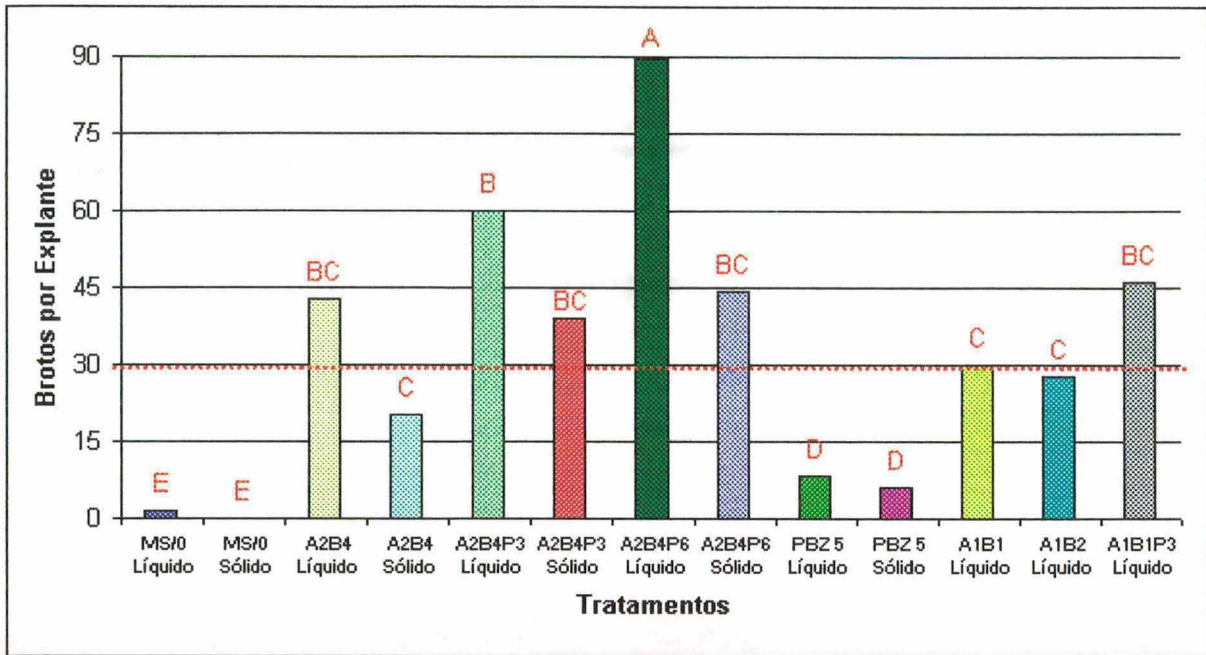


Figura 5 = Número médio total de Brotos por explante, cultivado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificado ou não com ágar (0,6%), após 142 dias de cultivo. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

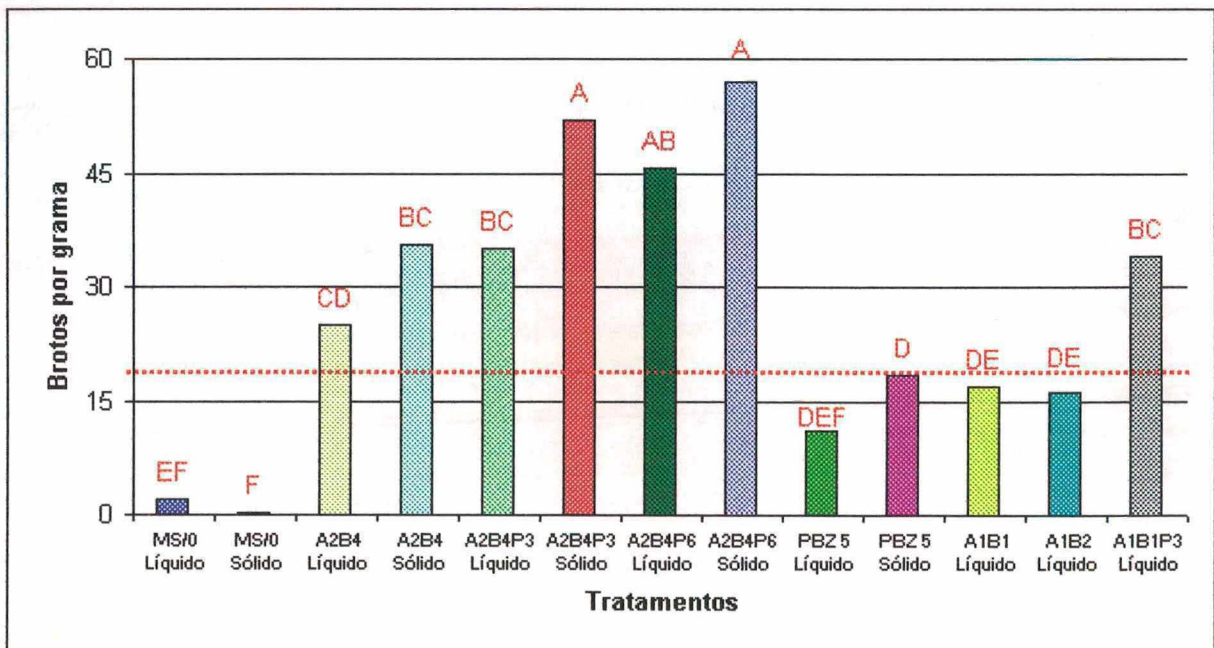


Figura 6 = Número médio total de brotos por grama, cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificado ou não com ágar (0,6%), após 142 dias de cultivo. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002

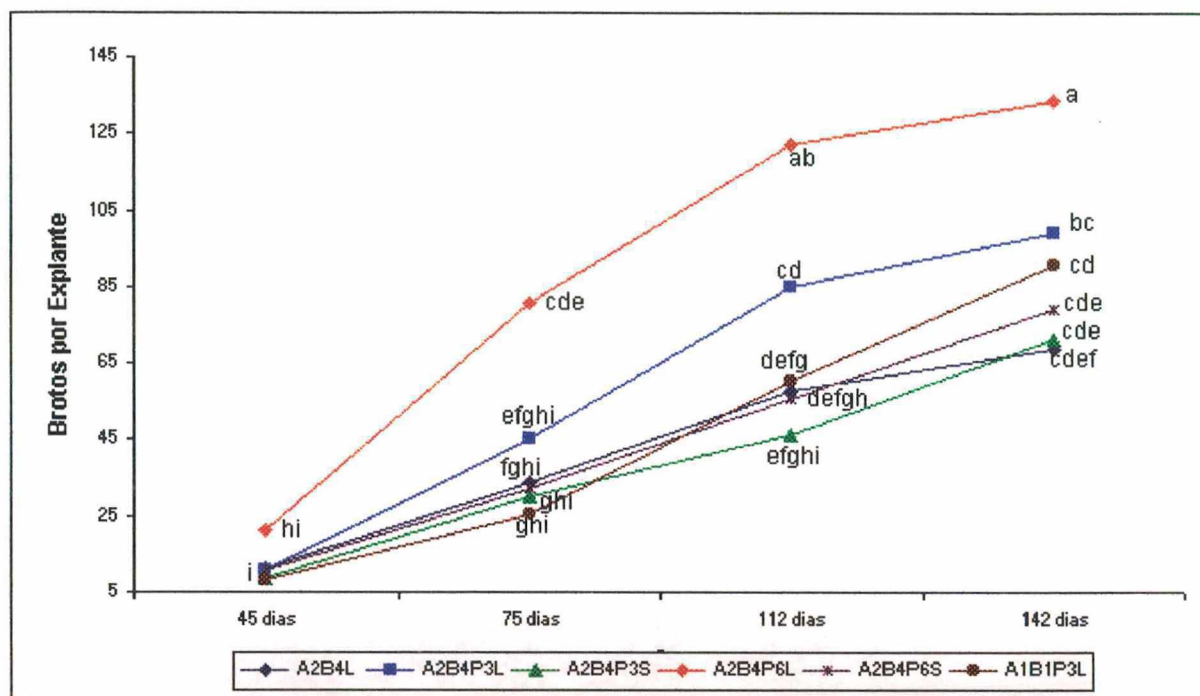


Figura 7 = Número médio de Brotos por explante nos subcultivos, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificado (S) ou não (L) com ágar (0,6%). Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002

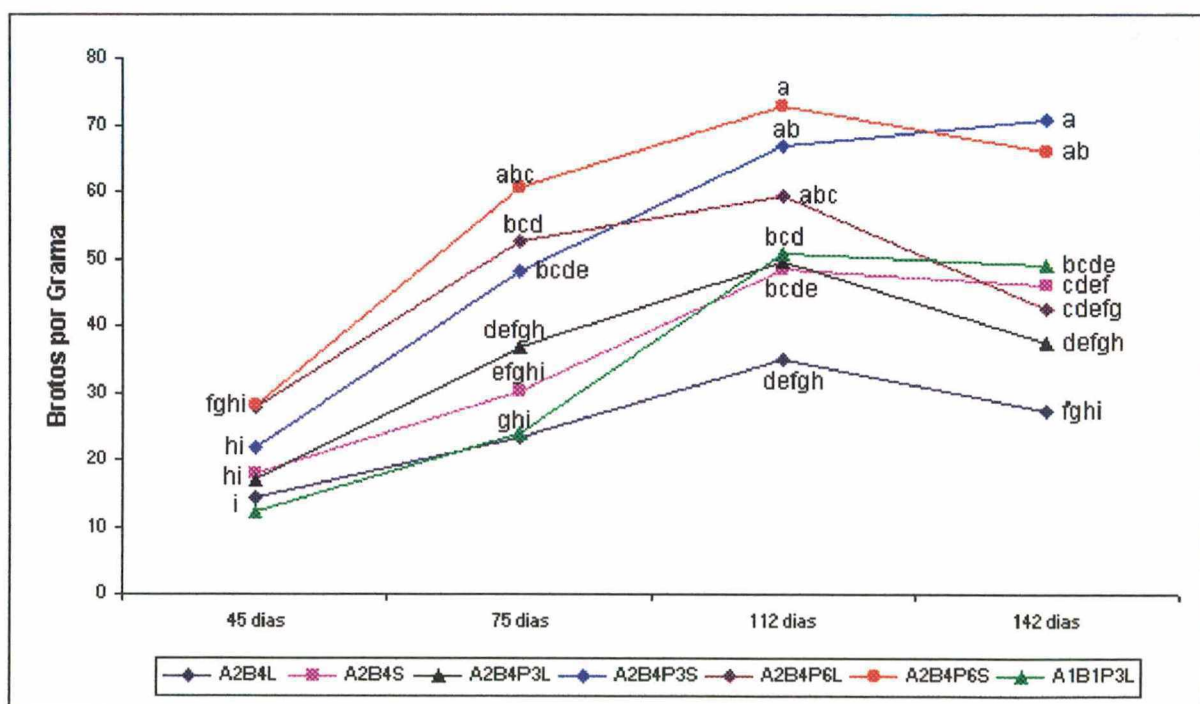


Figura 8 = Número médio de Brotos por grama nos subcultivos, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), gelificado (S) ou não (L) com ágar (0,6%). Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002

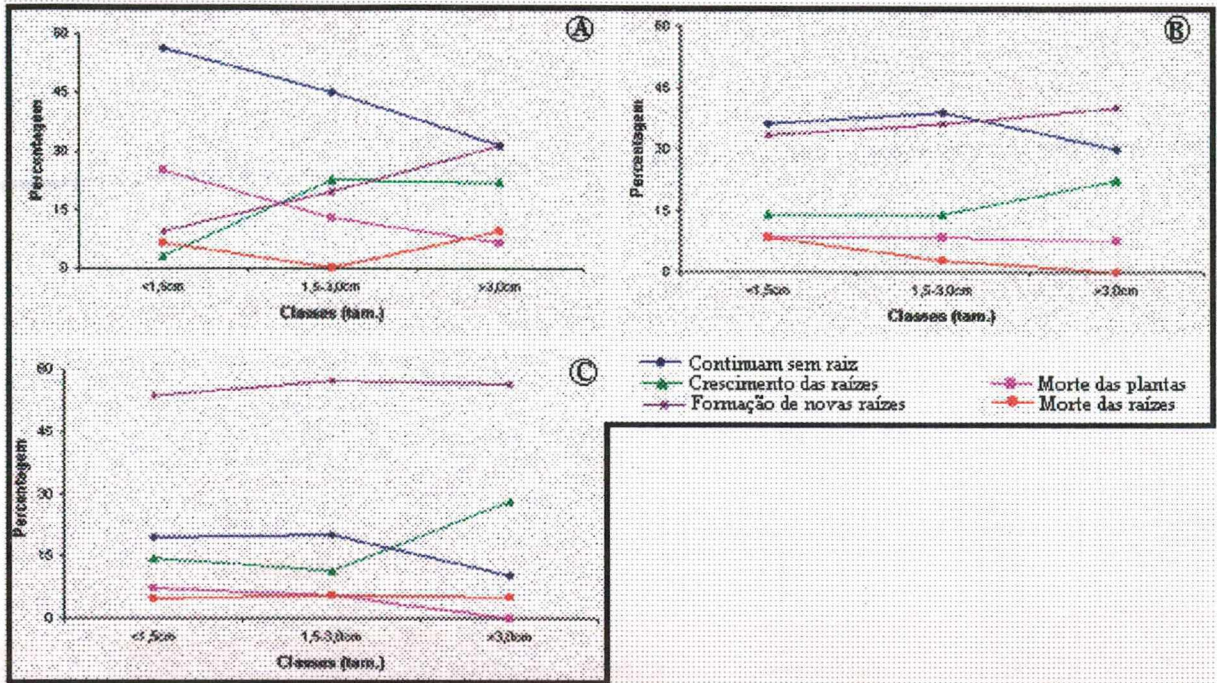


Figura 9 = Formação de raízes em plântulas micropropagadas de *Dyckia distachya* após cultivo em diferentes meios de cultura, entretanto sem a indução ao enraizamento. (A) 15 dias (B) 30 dias e (C) 60 dias após a transferência para as condições *ex vitro*. LFDGV-CCA/UFSC/2002



Figura 10 – Micropropagação de *Dyckia distachya*. **A.** Inoculação das sementes (1) e germinação após 30 dias (2). **B.** Aglomerado de brotos após os dois ciclos de cultivo (observar as múltiplas brotações). **C.** Plântulas originadas do alongamento das brotações laterais. **D.** Plantas aclimatizadas com sucesso após 6 meses. LFDGV-CCA/UFSC/2002



Figura 11 - Micropropagação de *Dyckia distachya*. **A.** Inoculação das sementes (1) e germinação após 30 dias (2). **B.** Plântulas alongadas individualmente em tubos de ensaio. **C.** Inoculação em meio líquido e **D.** em meio gelificado com ágar - Barra = 1cm. **E.** Aglomerado originado após os ciclos de cultivo (observar as múltiplas brotações). **F.** Alongamento das plântulas regeneradas em MS/0 - Barra = 1cm. **G.** Fitotoxicidade causada pelo PBZ (ver o secamento das folhas externas. **H** e **I.** Hiperhidricidade dos brotos causada pelos subcultivos em meio de cultura líquido (ver setas) - Barras 1cm e 5mm. **J.** Brotos perfeitamente formados na presença de PBZ - Barra 1cm e **K.** Brotos estiolados formados no tratamento A1B1 e A1B2 - Barra = 1cm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

CAPÍTULO III
INDUÇÃO À
EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A embriogênese somática ou assexual é o processo pelo qual as células somáticas se desenvolvem em estádios morfológicos característicos, com seqüências similares àquelas observadas no embrião zigótico e originando uma planta completa (Yeung, 1995; Dineshkumar *et al.*, 1995; De Jong *et al.*, 1993). Também pode ser definida pelo desenvolvimento de embriões a partir de uma célula simples ou de um grupo de células que não resultaram da fusão de gametas e que diferenciaram-se nos mesmos estádios ontogenéticos observados na embriogênese zigótica (Maheswaran & Williams, 1985).

Ao contrário do embrião zigótico, o embrião somático não apresenta conexão vascular com o tecido materno e, teoricamente, ele pode ser derivado de células de qualquer tipo de tecido. Este padrão de expressão da morfogênese é fundamentado através da totipotencialidade da célula vegetal, postulado pelo fisiologista alemão Haberlandt no início do século XX, para o qual, fornecidas as condições e estímulos adequados à uma célula nucleada, ela poderia originar uma planta completa, uma vez que células somáticas vegetais contêm todas as informações genéticas para tal (Merkle *et al.*, 1995).

Para De Jong *et al.* (1993), dependendo da interação entre complexos celulares e estímulos exógenos, as subseqüentes divisões celulares podem resultar no crescimento de um calo não organizado ou num crescimento polarizado que resulta na diferenciação das células embriogênicas e na formação e desenvolvimento do embrião.

A embriogênese somática é um método importante para a propagação em larga escala de genótipos superiores. Também é uma técnica aplicável aos estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (Yeung, 1995). Atualmente, esse sistema vem sendo utilizado para a produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas (Schultheis *et al.*, 1990; Guerra *et al.*, 1999b).

A propagação *in vitro* via embriogênese somática oferece um grande potencial para a multiplicação clonal, onde uma célula isolada pode ser induzida a produzir primeiramente um embrião e então uma planta completa (Rout *et al.*, 1999). A embriogênese também pode evitar os riscos de obtenção de plantas quiméricas e

facilitar a aplicação para seleção de mutantes e para a tecnologia de DNA recombinante (Luo *et al.*, 1999).

Uma das principais aplicações da embriogênese somática, em programas de melhoramento de plantas perenes, relaciona-se com a possibilidade da fixação do ganho genético pela captura dos componentes aditivos e não aditivos da variância genética (Guerra *et al.*, 1999b). O primeiro é baseado no efeito independente dos alelos, enquanto que o segundo, normalmente perdido nos processos de reprodução sexuada, é baseado na interação dos alelos, dentro ou entre locus (Durzan, 1988). Este processo pode iniciar com o cruzamento controlado entre plantas que já de antemão, sabe-se que produzirão uma progênie superior (Guerra *et al.*, 1999b).

O sucesso na iniciação e estabelecimento de culturas embriogênicas depende basicamente do tipo e estágio fisiológico dos explantes. Este é o primeiro passo importante para a transição de células somáticas em células embriogênicas (De Jong *et al.*, 1993). Por isto, é fundamental o reconhecimento dos explantes que tenham competência morfogenética e que estejam em estágio específico de desenvolvimento (Merkle *et al.*, 1995; Harry & Thorpe, 1991). Entretanto, não está claro se esta observação reflete diferenças genéticas na habilidade das células somáticas tornarem-se embriogênicas ou se é devido à frequência de um tipo particular de células responsivas nestes tecidos (De Jong *et al.*, 1993).

Potencialmente, todos os tecidos vegetais têm capacidade para originar calos *in vitro*, contudo poucos explantes têm habilidade para produzir calos embriogênicos. Comumente se utiliza parte de plântulas como cotilédones, hipocótilos e embriões (George, 1993).

Explantes embrionários possuem maior competência morfogênica, podendo suas células apresentar receptores específicos e de maior sensibilidade aos hormônios vegetais (Guerra *et al.*, 1999; Firn, 1986), ou mesmo maior número de receptores para essas substâncias presentes no meio de cultura (Guerra *et al.*, 1999b), resultando na formação de maior número de embriões somáticos em relação aos explantes originados de tecidos maduros.

Bases foliares de monocotiledôneas apresentam vascularização e podem conter células competentes para a rediferenciação celular, quando ativadas por sinais químicos como os fitoreguladores (Hosoki & Asahira, 1980).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos que controlam a embriogênese somática, ainda são limitadas as fontes de explantes que contêm células receptivas ou tecidos responsivos, capazes de reagirem a sinais ambientais ou químicos específicos de desenvolvimento (Yeung, 1995). Entre estes sinais, os fitorreguladores podem alterar a sensibilidade das células responsivas (Guerra *et al.*, 1999b) e induzir a formação de células competentes (Toonen *et al.*, 1996). Tal como outros sistemas de regeneração *in vitro*, a embriogênese somática também apresenta vários fatores que afetam as respostas obtidas. Neste sentido, Guerra & Handro (1998 e 1991), observaram que a rota da embriogênese somática em *Euterpe edulis* ocorria como resposta à interação entre o estágio fisiológico do explante e o tipo e concentração de fitorreguladores presentes no meio de cultura.

Em um explante, certas células estão pré-condicionadas para os eventos morfogênicos que levam à embriogênese (Thorpe, 1980). Por esta razão a presença de reguladores de crescimento exógenos, comumente o 2,4-D, não só inicia o desenvolvimento dos embriões, como estimula a multiplicação clonal das células pré-determinadas (Litz & Jarret, 1991). O mecanismo de ação das auxinas nos processos fisiológicos e regulatórios, está associado à presença de receptores protéicos localizados na membrana, no citoplasma e no núcleo celular (Nato *et al.*, 2000). Quando o núcleo recebe o sinal, há ativação da RNA-polimerase II específica para a transcrição de genes envolvidos na regulação da divisão celular (Van der Linde, 1990).

Até meados da década de 90, a indução da embriogênese somática em angiospermas tinha sido descrita para 280 gêneros em 94 famílias, sendo que 60% das espécies induzidas pertenciam às famílias Compositae, Gramineae, Liliaceae, Orchidaceae, Rosaceae e Rutaceae (Sharma & Thorpe, 1995).

São escassos os protocolos de micropropagação de bromélias via embriogênese somática. Os poucos protocolos existentes para monocotiledôneas se restringem a *Triticum*, *Coccus*, *Arachis*, *Zea*, *Musa* e algumas espécies da família Orchidaceae e Bromeliaceae.

A maioria dos protocolos existentes para a micropropagação de bromélias baseiam-se na organogênese direta, devido a facilidade de se induzir brotações a partir de um explante inicial, geralmente semente. No entanto, quando se pretende clonar um genótipo de interesse, a organogênese se mostra limitante, devido a

dificuldade de se introduzir *in vitro* órgãos competentes, como por exemplo gemas axilares. Nesta visão, a embriogênese somática pode ser uma metodologia promissora, visto o fato de que, uma vez estabelecida uma cultura embriogenética, seu potencial morfogenético pode ser mantido por longo período de tempo (Rech Filho *et al.*, 2001; Alves, 2000).

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo principal estudar a resposta de diferentes explantes frente aos fatores indutores da embriogênese somática, uma vez que, estabelecido um protocolo seguro, utilizando-se explantes gerados *in vitro*, pode-se ampliar os estudos com a utilização de explantes retirados diretamente das plantas matrizes, às quais se pretende micropropagar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Órgãos Florais

Do Banco de germoplasma *in situ* e *ex situ* (ver Capítulo V) flores imaturas (antes da ântese) foram coletadas nos anos de 1999 e 2000, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração até o LFDGV-CCA/UFSC.

No laboratório, as flores foram lavadas em uma solução com água destilada e três gotas de detergente comercial (louça) e triplamente enxaguadas para uma prévia limpeza. Sob CFL foram mergulhadas em álcool 70% por um minuto, seguido por imersão em alvejante comercial (2% de NaOCl) por 15 minutos e triplo enxágue com água destilada, deionizada e autoclavada.

Após a desinfestação, as peças florais foram destacadas e inoculadas separadamente em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e gelificadas com ágar (0,6%). Foram testados seis tratamentos: 2,4-D (10 e 20 μ M) Picloram (5 e 10 μ M) e 2,4,5-T (5 e 10 μ M). Em todos os tratamentos adicionou-se 1 μ M de Kin. Além destes, adicionou-se mais um tratamento isento de fitorregulador – MS/0, como controle. As avaliações se deram a cada 30 dias.

2.2. Bases Foliaves

Sementes foram coletadas, desinfestadas e introduzidas *in vitro* para germinação, conforme já descrito no capítulo anterior. Após 90 dias, as plântulas regeneradas com tamanho $\geq 1,5$ cm foram utilizadas neste experimento. As folhas foram destacadas e inoculadas em placas de Petri contendo 30mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e gelificadas com ágar (0,6%). Foram realizados dois experimentos independentes para se avaliar o efeito do tipo e da concentração das auxinas.

Experimento I

Foram testados 12 tratamentos: 2,4-D (2,5; 5 e 10 μ M), 2,4,5-T (2,5; 5 e 10 μ M), Picloram (1; 2,5 e 5 μ M), 2,4-D (5 μ M) + BAP (2 μ M), 2,4,5-T (5 μ M) + BAP (2 μ M) e Picloram (2,5 μ M) + BAP (2 μ M), mais um tratamento isento destes – MS/0, como controle. Aos 90 dias avaliou-se a percentagem de indução de embriogênese somática, bem como as características morfológicas das culturas embriogênicas.

Experimento II

Manteve-se o 2,4-D e mudou-se a fonte de citocinina para Kin. Foram testados quatro tratamentos: 2,4-D (2,5; 5; 10 e 20 μ M) adicionados de Kin (1 μ M), mais um tratamento isento destes – MS/0, como controle. O experimento foi arranjado em DCC com três replicatas, sendo que após 90 dias avaliou-se a percentagem de indução de embriogênese somática, bem como as características morfológicas das culturas obtidas. Os dados de percentagem de indução de culturas embriogênicas foram transformados em $\log(x+2)$ e submetidos a Análise de Variância e teste de separação de médias SNK ($p \leq 0,05$).

2.3. Embriões zigóticos

Sementes de *Dyckia distachya* originadas de plantas mantidas no banco de sementes do LFDGV-CCA/UFSC (Capítulo V) foram submetidas a uma prévia lavagem com uma solução de água destilada com a adição de três gotas de detergente comercial (louça) e triplamente enxaguadas com água destilada. Sob fluxo laminar as mesmas foram mergulhadas em álcool 70%, por três minutos, seguido de alvejante comercial (5% de NaOCl), por 30 minutos e por cinco enxágües com água destilada, deionizada e autoclavada, conforme protocolo estabelecido por Mercier & Kerbauy (1993). Após a desinfestação, as sementes com sua parte alada removida, foram inoculadas em placas de Petri com 30mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), e gelificadas com ágar (0,6%), sendo inoculadas 10 sementes por placa. Foram realizados dois experimentos independentes para se avaliar o efeito do tipo e da concentração das auxinas.

Experimento I

Foram testados oito tratamentos: 2,4-D (1,25; 2,5; 5 e 10 μ M), Picloram (1,25; 2,5; 5 e 10 μ M) mais um tratamento isento destes – MS/0, como controle. O experimento foi arranjado em DCC com quatro placas por tratamento, sendo que cada tratamento foi repetido três vezes. Onze semanas após a indução avaliou-se a percentagem de indução e as características morfológicas das culturas embriogênicas.

Para continuação do experimento foram testadas duas estratégias para multiplicação ou maturação das culturas embriogênicas. Para maturação, as culturas com aparência amarelo-cítrico, granulares e friáveis foram repicadas para placas de Petri contendo 30mL de meio MS com 16 combinações de PEG e Maltose (P_{0%}M_{0%}, P_{0%}M_{3%}, P_{0%}M_{6%}, P_{0%}M_{9%}, P_{3%}M_{0%}, P_{3%}M_{3%}, P_{3%}M_{6%}, P_{3%}M_{9%}, P_{6%}M_{0%}, P_{6%}M_{3%}, P_{6%}M_{6%}, P_{6%}M_{9%}, P_{9%}M_{0%}, P_{9%}M_{3%}, P_{9%}M_{6%} e P_{9%}M_{9%}). As culturas foram incubadas em estufa incubadora com temperatura controlada em 25 \pm 1°C, no escuro, e repicadas cinco vezes a cada 20 dias.

Para se estabelecer um protocolo de conversão para embriões somáticos e plântulas, as demais culturas embriogênicas foram repicadas para placas

de Petri com 30mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) + sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), e gelificadas com ágar (0,6%), suplementado com 2iP (12 μ M) + ANA (0,5 μ M), mais carvão ativado (1,5%). As culturas foram mantidas à luz, com uma irradiância de 60 μ M/m²/s de fótons de luz e fotoperíodo de 16 horas. A cada vinte dias as placas foram repicadas para as mesmas condições.

Oito meses após a indução e subseqüentes repicagens avaliou-se a percentagem de indução de embriões, bem como o número de embriões formados, sendo que os dados foram transformados em log (x+2) e submetidos a análise de variância ANOVA e ao teste de separação de médias SNK ($p \leq 0,05$).

Experimento II

Com a realização do experimento anterior percebeu-se que a melhor concentração para indução de massas embriogênicas era de 5 μ M; sendo assim objetivou-se avaliar o efeito dessa concentração sob as auxinas 2,4-D e Picloram com ou sem a adição das citocininas BAP ou Kin.

Foram testados seis tratamentos: 2,4-D (5 μ M), Picloram (5 μ M), 2,4-D (5 μ M) + BAP (1 μ M), 2,4-D (5 μ M) + Kin (1 μ M), Picloram (5 μ M) + BAP (1 μ M) e Picloram (5 μ M) + Kin (1 μ M), mais um tratamento isento destes – MS/0, como controle. O experimento foi arranjado em DCC com quatro placas por tratamento, sendo cada tratamento repetido três vezes. Após 10 semanas de indução os dados da percentagem de massas que não responderam, a percentagem de embriões formados e o número de embriões formados foram transformados em log (x+2) e submetidos a análise de variância ANOVA e ao teste de separação de médias SNK ($p \leq 0,05$).

As colônias celulares que formaram embriões foram repicadas para placas de Petri com 30mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), carvão ativado (1,5%) e gelificadas com ágar (0,6%). Foram testados três tratamentos para a conversão dos embriões somáticos: 2iP (12 μ M) + ANA (0,5 μ M), AG₃ (10 μ M) e Sacarose (6%). As culturas foram mantidas na luz, com uma irradiância de

$60\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ de fótons de luz e fotoperíodo de 16 horas, para conversão e germinação dos embriões somáticos. A cada vinte dias as placas foram repicadas para as mesmas condições.

O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 com a adição de NaOH ou HCl antes da autoclavagem a 121°C e 1,5atm. As culturas foram manipuladas sob condições assépticas em CFL, e seu desenvolvimento foi em estufa incubadora com temperatura ajustada para $25\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $60\pm 5\%$, na ausência de luz, exceto quando estes foram de conversão onde o desenvolvimento se deu em sala de crescimento com uma irradiância de $60\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ de fótons de luz e fotoperíodo de 16 horas.

2.4. Avaliações histológicas

Para o estudo histológico das culturas através da utilização de embriões zigóticos como fonte de explante, amostras foram retiradas a cada dois dias e fixadas em FAA (formalina 40% : ácido acético glacial : álcool 70%, 5:5:90) por 48 horas. O material foi desidratado em série etílica e embebido em parafina/xilol. O material foi secionado em micrótono com seção de $5\mu\text{m}$, que foram coradas em safranina e fast green e visualizadas sob microscópio Olympus BX 40.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de peças florais como explantes, deve-se ao fato desses tecidos serem, por natureza, altamente competentes e responsivos. Sendo assim, e sendo este um tecido jovem e de origem somática, a utilização dele seria uma boa fonte de material competente originado da planta mãe, o que facilitaria os processos de clonagem.

No presente trabalho, a justificativa para o emprego de explantes de origem somática derivou do fato de que o emprego de embriões zigóticos como fonte de explantes não assegura a conformidade clonal (Torné *et al.*, 1997). Assim, para fins

de clonagem, o uso de embriões zigóticos como fonte de explantes de espécies com polinização cruzada pode ser considerado uma limitação.

Sessenta dias após a inoculação, algumas peças florais começaram a mostrar sinais de resposta. Muitas delas se intumesceram, as vezes dobrando de tamanho, porém foram raras as formações de calos nos explantes. Na figura 2, são mostrados calos amarelo-cítricos e friáveis. No entanto, essa resposta limitou-se a poucos explantes. Estes dados diferem dos obtidos por Stefanello (2000), quando altas percentagens de indução (81,7%) foram obtidos a partir da inoculação de filamentos de *Feijoa sellowiana* em meio MS suplementando com Picloram (10 μ M) + Kin (1 μ M). Stefanello (2000) e Torné *et al.* (1997) descreveram que pétalas florais são explantes facilmente induzíveis aos processos morfogenéticos que levam à embriogênese somática. No entanto, no trabalho aqui apresentado essa característica não foi observada, visto que foram raros os casos de indução de calos nestes explantes.

Na indução à embriogênese somática em peças florais de *Feijoa sellowiana*, Stefanello (2000) obteve melhores resultados com a utilização de Picloram (10 μ M) + Kin (1 μ M). No entanto, na indução a embriogênese somática e posterior conversão em plantas de *Araujia sericifera*, concentrações moderadas de 6-benzilaminopurina se mostraram mais eficientes (Torné *et al.*, 1997).

Apesar das características morfológicas dos calos apresentados na figura 2 serem promissores, nenhuma cultura induzida neste experimento se manteve estável após 100 dias. Passado algum tempo, todas as culturas obtidas oxidavam e morriam, não respondendo a nenhum outro estímulo embriogenético.

Para bases foliares as respostas foram bem diversas. No primeiro experimento poucos explantes originaram culturas embriogênicas. Muitas destas culturas apresentaram-se filamentosas ou compactas (Figura 3), o que dificultou os processos seguintes da embriogênese somática.

Ao realizar-se o experimento I, percebeu-se que o 2,4-D respondia melhor do que as demais auxinas e também a citocinina Kin era a mais citada como complemento nos trabalhos com embriogênese somática (Castillo *et al.*, 2000). Isso mostra que o 2,4-D quando combinado com Kin pode elevar a percentagem de indução de culturas embriogênicas.

Na figura 1 observa-se que não houve diferença estatística para a percentagem de indução de massas celulares na presença de 2,4-D nos níveis de 2,5 ou 10 μ M. No entanto, a concentração de 10 μ M mostrou-se levemente superior, com uma percentagem de indução de 36,33% dos explantes inoculados, seguidas por 33,33% de indução em 2,4-D (2,5 μ M). Estes resultados diferem daqueles obtidos por Little *et al.* (2000) na indução e embriogênese somática em epicótilos de amendoim, no qual, somente concentrações de 2,4-D acima de 41 μ M foram eficientes. No entanto, se comparados aos resultados obtidos por Chen & Chang (2000), a percentagem de 36,33% obtida neste trabalho pode ser considerado satisfatória, visto que esse autor obteve percentagens inferiores a 10% quando lâminas foleares, hastes e raízes de *Oncidium* foram utilizadas como explante e induzidas em 2,4-D + TDZ. Em estudos com *Begonia gracilis*, Castillo & Smith (1997) obtiveram 30% de indução morfogénica em lâminas foleares com a utilização de 0,5mg/L de Kin, no entanto essa percentagem subiu para 80% quando pecíolos foleares foram usados.

Em sua grande maioria, as culturas induzidas eram friáveis e granulares, diferentemente das massas celulares induzidas no experimento I, as quais eram filamentosas e com pouca granulação (Figura 4). Apesar desse aspecto ser bastante promissor, quando estas massas celulares foram repicadas para meios de desenvolvimento de embriões somáticos na presença de 2-iP (12 μ M) + ANA (0,5 μ M) nenhuma progrediu, sendo que em sua maioria oxidaram e morreram. As culturas que não regrediram, resultaram em calos rizogénicos, como já descrito por diversos autores (Franco & Ferreira, 2001; Alves, 2000; Castillo *et al.*, 2000).

Apesar dos recentes sucessos, relatados na bibliografia, com a utilização de explantes foleares na indução da embriogênese somática (Castillo *et al.*, 2000; Chen & Chang, 2000; Choffe *et al.*, 2000; Little *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 1999; Castillo & Smith, 1997), percebe-se com esse trabalho que mais estudos são necessários para o bom entendimento da rota morfogénica e da indução e expressão embriogénica de bases foleares de *Dyckia distachya*, uma vez que, nas condições experimentais empregadas não foi possível a maturação dos embriões somáticos.

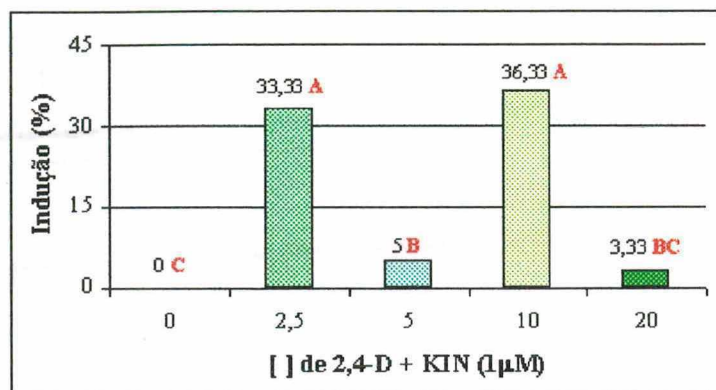


Figura 1 – Taxas de indução embriogênica a partir de bases foliares de *Dyckia distachya*, em resposta a diferentes concentrações de 2,4-D e Kin ($1,0\mu\text{M}$), em meio de cultura basal MS (Murashige & Skoog, 1962) gelificado, 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $p\leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Os melhores resultados de indução embriogênica em *Dyckia distachya* foram obtidos quando embriões zigóticos foram usados como explante, assim como já relatado para *Feijoa sellowiana* (Stefanello, 2000). No entanto, sementes de *Dyckia distachya* são de tamanho reduzido, o que inviabiliza o processo de excisão do embrião zigótico, sendo assim, sementes inteiras foram inoculadas para germinação, originando massas celulares, segundo protocolo estabelecido por Eapen & George (1990).

Na figura 5-F nota-se que após dois dias em cultura iniciou-se a germinação, e na presença de uma auxina (2,4-D ou Picloram) ocorreu um intenso processo de divisão celular, dando origem, 30 dias após, a uma estrutura calosa (Figura 5-B), a qual após sucessivas divisões mitóticas, originou uma massa celular caracteristicamente embriogênica (Figura 5-D).

No primeiro experimento, quando diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram foram usadas, observou-se que o Picloram ($10\mu\text{M}$) foi capaz de induzir resposta em 81,82% dos embriões zigóticos inoculados, após 60 dias em cultura. Quanto ao 2,4-D, conclui-se que concentrações entre 1,25 e $10\mu\text{M}$ foram adequadas para promover a indução de culturas embriogênicas em 70% dos embriões zigóticos inoculados (Tabela 1). Se considerarmos que as sementes de *Dyckia distachya* possuem viabilidade entre 70 e 80%, pode-se concluir que tanto o Picloram quanto o 2,4-D foram capazes de induzir respostas embriogênicas na quase totalidade dos embriões zigóticos viáveis.

Tabela 1 – Taxa de indução embriogenética a partir de embriões zigóticos de *Dyckia distachya*, em resposta a diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram, em meio de cultura basal MS (Murashige & Skoog, 1962) gelificado, 60 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $p \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

[μM]	Picloram	2,4-D
0	0 b	0 b
1,25	75,71 a	70,00 a
2,5	73,75 a	71,11 a
5	77,5 a	69,17 a
10	81,82 a	71,11 a
X	77,71 A	70,26 A
CV (%) = 14,95		

* Letras minúsculas entre os tratamentos e maiúsculas entre os fitoreguladores

Os dados da percentagem de indução embriogenética obtidos neste trabalho podem ser considerados excelentes se analisarmos a percentagem de 25% de indução alcançada por Torné *et al.* (1992), em embriões zigóticos de *Araujia sericifera* cultivados com 2,4-D ($9,1 \mu\text{M}$). Ou, ainda, quando comparados aos valores de 60% de indução alcançados por Qureshi *et al.* (1989), em *Triticum aestivum* com a utilização de 2mg/L de 2,4-D + 1mg/L de ABA.

Quando se comparam as concentrações de 2,4-D e de Picloram usadas, percebe-se que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (SNK $p \leq 0,05$), sendo que estes são diferentes do tratamento controle (MS/0) onde os embriões zigóticos apenas germinaram (Figura 5-C).

Cento e vinte dias após a inoculação dos embriões zigóticos, observa-se a indução embriogenética em quase todos os tratamentos. O Picloram ($5 \mu\text{M}$) foi capaz de induzir culturas embriogenéticas em 60,94% dos explantes inoculados, com uma média de 109,72 embriões por placa. Já o 2,4-D mostrou-se quantitativamente inferior ao Picloram, porém esta diferença não foi significativa (SNK $p \leq 0,05$). Na faixa de $2,5 \mu\text{M}$ de 2,4-D, a indução embriogenética foi de 37,26% com uma média de 36,67 embriões por placa. Já na presença de 2,4-D ($1,25 \mu\text{M}$), 33,60% de indução embriogenética foi obtida, com uma média de 58,33 embriões por placa (tabela 2). Todos os embriões observados nesta fase encontravam-se nos estádios globulares, torpedos ou às vezes em estádios cotiledonares.

Tabela 2 – Percentagem média de indução e número de embriões somáticos formados em EZ de *Dyckia distachya*, cultivados *in vitro*, em resposta a diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram, em meio de cultura basal MS gelificado, 120 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $p \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

[μM]	Indução embriogenética (%)		N.º de embriões formados	
	Picloram	2,4-D	Picloram	2,4-D
1,25	5,55 B	33,60 A	10,17 A	58,33 A
2,5	7,18 B	37,26 A	23,67 A	36,67 A
5,0	60,94 A	34,34 A	109,72 A	33,22 A
10	56,51 A	36,67 A	77,78 A	25,83 A
CV (%)	19,13		31,11	

* Média de 3 repetições.

Segundo Guerra *et al.* (1999b) após a formação dos pró-embriões, a estratégia seguinte é interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para promover a diferenciação celular, desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos. Estes pró-embriões são estimulados a seguir o desenvolvimento normal pela retirada das auxinas do meio de cultura, pela adição de ABA, citocininas e agentes que provoquem um estresse osmótico. O ciclo de maturação gera embriões somáticos que podem ser convertidos à plântulas ou então serem encapsulados para a obtenção de sementes sintéticas.

No entanto, no presente trabalho, quando os embriões foram retirados dos ciclos repetitivos de divisão celular e transferidos para diferentes combinações de PEG e Maltose para a conversão, quase que em sua totalidade, as culturas embriogênicas oxidaram ou tornaram-se rizogênicas (Figura 5-I), sendo que nenhuma cultura progrediu para estádios mais avançados do desenvolvimento embrionário.

Algumas respostas favoráveis foram evidenciadas quando os embriões somáticos foram transferidos para a luz e repicados a cada 20 dias em meio de cultura com 2-iP (12 μM) + ANA (0,5 μM). Nesse tratamento, as culturas tornaram-se verdes, e com aparente desenvolvimento.

A germinação dos embriões somáticos consiste em um desenvolvimento bipolar completo, com distinto desenvolvimento de parte aérea e radicular (Dineshkumar *et al.*, 1995). Sendo assim, o desenvolvimento completo dos embriões somáticos e conversão para plantas não foi observado neste estudo.

Num segundo experimento, quando fixou-se a concentração de 2,4-D e Picloram em 5 μM e variou-se apenas a citocinina (BAP ou Kin - 1 μM) respostas

distintas foram observadas. Como mostra a Tabela 3, os embriões zigóticos inoculados em meio isento de fitorreguladores, não tiveram formação de calos, sendo que 50% dos embriões zigóticos não responderam e os demais apenas germinaram, como evidenciado na figura 5-C. No entanto, nos embriões zigóticos inoculados em picloram, independente da citocinina usada, foram observadas percentagem elevadas de indução embriogenética. A melhor resposta para a percentagem de indução ocorreu em resposta ao Picloram (5 μ M) e com Kin (1 μ M), onde 59,17% dos embriões zigóticos induziram culturas embriogênicas, com a formação de 165,83 embriões por placa. Neste tratamento, o 2,4-D mostrou-se inferior ao Picloram na indução de culturas embriogenéticas e no número de embriões formados. Na presença de 2,4-D (5 μ M) 39,48% dos embriões zigóticos inoculados tornaram-se embriogênicos, após 10 semanas de inoculação. Neste tratamento foram formados 65,92 embriões por placa.

Tabela 3 – Percentagem média de não resposta, percentagem de indução e número de embriões somáticos formados em EZ de *Dyckia distachya*, cultivados *in vitro*, em resposta a diferentes combinações de auxinas e citocininas, em meio de cultura basal MS, gelificado, 10 semanas após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $p \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Auxina*		Citocinina		Sem Resposta	Porcent. de Embriogênese	N.º de Embriões
2,4-D	Picloram	BAP	Kin			
0	0	0	0	50,00 B	0,00 D	0,00 C
5	0	0	0	13,45 A	39,48 B	65,92 B
5			1	25,00 AB	36,67 B	64,75 B
5		1		38,33 AB	25,83 C	35,19 B
	5	0	0	28,33 AB	56,67 A	150,33 A
	5		1	17,50 A	59,17 A	165,83 A
	5	1		33,89 AB	58,06 A	141,75 A
CV (%)				11,62	3,79	6,82

[] em μ M

Quando analisadas as interações existentes entre as concentrações de auxinas e citocininas, observou-se uma superioridade do Picloram em relação ao 2,4-D. Para a percentagem de embriogênese, 57,96% dos embriões zigóticos inoculados em Picloram tornaram-se embriogênicos, enquanto que para o 2,4-D, essa resposta foi observada em apenas 33,99% dos casos. Resposta semelhante foi verificada no número de embriões formados, onde 152,64 e 55,29 embriões por placa foram induzidos em Picloram e 2,4-D, respectivamente. Esses valores são estatisticamente diferentes (SNK $p \leq 0,05$). Entretanto, quando analisada as

combinações de citocininas usadas, não verificou-se diferença (SNK $p \leq 0,05$) entre presença ou ausência de BAP ou Kin como complemento (ver anexo).

Neste experimento, estádios completos de embriogênese somática, com embriões globulares, torpedo e cotiledonar puderam ser observados em alguns tratamentos (Figura 5-M).

Os dados apresentados aqui são diferentes dos descritos para *Feijoa sellowiana* (Stefanello, 2000), onde o 2,4-D mostrou-se superior ao Picloram na indução embriogenética. No entanto há diversos relatos mostrando superioridade do Picloram em relação ao 2,4-D (Little *et al.*, 2000; Dineshkumar *et al.*, 1995). Bach (1992) descreve que em *Freesia hybrida*, o Picloram induziu de três a doze vezes mais embriões somáticos do que o 2,4-D. Dineshkumar *et al.* (1995) complementam que o Picloram (0,1 a 0,25mg/L) é uma potente auxina capaz de induzir calos embriogênicos. Entretanto, para *Narcissus pseudonarcissus* as auxinas ANA e 2,4-D, em diversas concentrações, promoveram a formação de embriões somáticos enquanto o Picloram inibiu completamente o processo (Sage *et al.*, 2000).

Os pró-embriões formados neste experimento foram inoculados em meio cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de Sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), suplementado com 2-iP (12 μ M) + ANA (0,5 μ M), AG₃ (10 μ M) ou apenas com Sacarose (6%) como agente osmótico para conversão e germinação.

Após 60 dias de inoculação não foram observadas nenhuma conversão total dos embriões somáticos. A maioria das culturas embriogenéticas, ao serem expostas a luz, tornaram-se verdes, e com aparente resposta as citocininas (Figuras 5-G e J). As melhores respostas foram observadas quando 2-iP (12 μ M) + ANA (0,5 μ M) foram usados. Observou-se neste tratamento início de conversão dos embriões somáticos (Figuras 5-J e K), no entanto, com o passar do tempo a maioria dos embriões somáticos necrosaram e morreram, fato que já foi documentado por Alves (2000) em *Vriesea reitzii*.

Guerra & Handro (1988) conseguiram boas taxas de conversão, quando embriões somáticos de *Euterpe edulis* foram inoculados em meio suplementado com 2-iP (2,5mg/L) + ANA (0,1mg/L). Cruz *et al.* (1990) obtiveram

boas taxas de conversão quando embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* em fase pré-cotiledonar foram inoculados em MS suplementado com $1,46\mu\text{M}$ de AG_3 .

Segundo Qureshi *et al.* (1989), muitas espécies de monocotiledôneas oferecem uma limitada fonte de explante para indução de calos embriogênicos, sendo o embrião zigótico imaturo ou em estádios primários de desenvolvimento o melhor material a ser usado.

Neste estudo, boas taxas de embriogênese somática foram alcançadas com a utilização de sementes maduras de *Dyckia distachya*; entretanto quando se utilizou outros explantes, como peças florais e bases foliares, respostas favoráveis foram raras.

Segundo Guerra *et al.* (1999b) muitos fatores estão envolvidos na modulação da embriogênese somática: o tipo e a concentração da auxina e da citocinina, dos agentes osmóticos, da luz e da temperatura fortemente influenciam na indução de massas celulares embriogênicas. No presente trabalho, apesar de todos esses fatores terem sido estudados, não foi possível estabelecer um protocolo completo para indução a embriogênese somática e posterior conversão em plantas de *Dyckia distachya* Hassler, indicando que mais estudos devem ser realizados para essa finalidade.

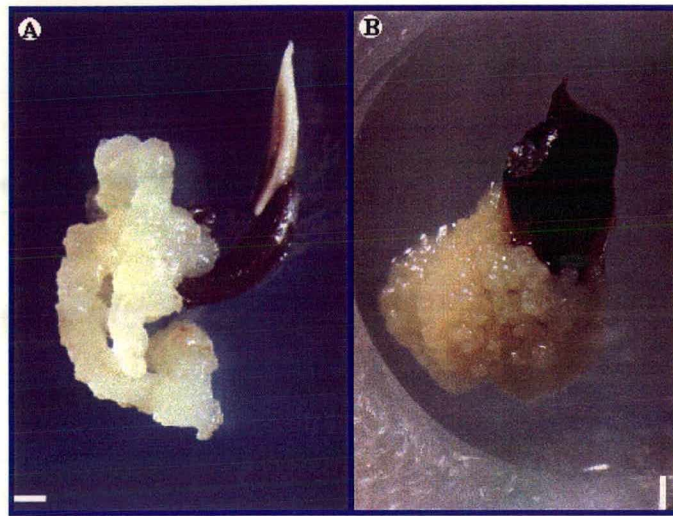


Figura 2 – Indução embriogênica em peças florais de *Dyckia distachya* em resposta a diferentes fitorreguladores. (A) Estame com formação de calo em resposta ao 2,4-D (20 μ M) + Kin (1 μ M), 90 dias após a inoculação e (B) Pétala floral com formação de calo em resposta ao Picloram (5 μ M) + Kin (1 μ M), 90 dias após a inoculação. Barras 0,88mm e 1,173mm, respectivamente. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

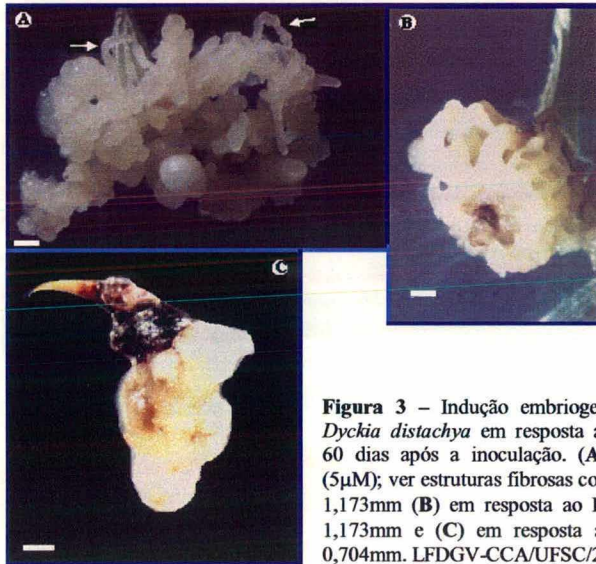


Figura 3 – Indução embriogênica em bases florais de *Dyckia distachya* em resposta a diferentes fitorreguladores, 60 dias após a inoculação. (A) em resposta ao Picloram (5 μ M); ver estruturas fibrosas com pouca granulação - Barra - 1,173mm (B) em resposta ao Picloram (2,5 μ M) - Barra = 1,173mm e (C) em resposta ao 2,4-D (5 μ M) - Barra = 0,704mm. LFDGV-CCA/UFSC/2002

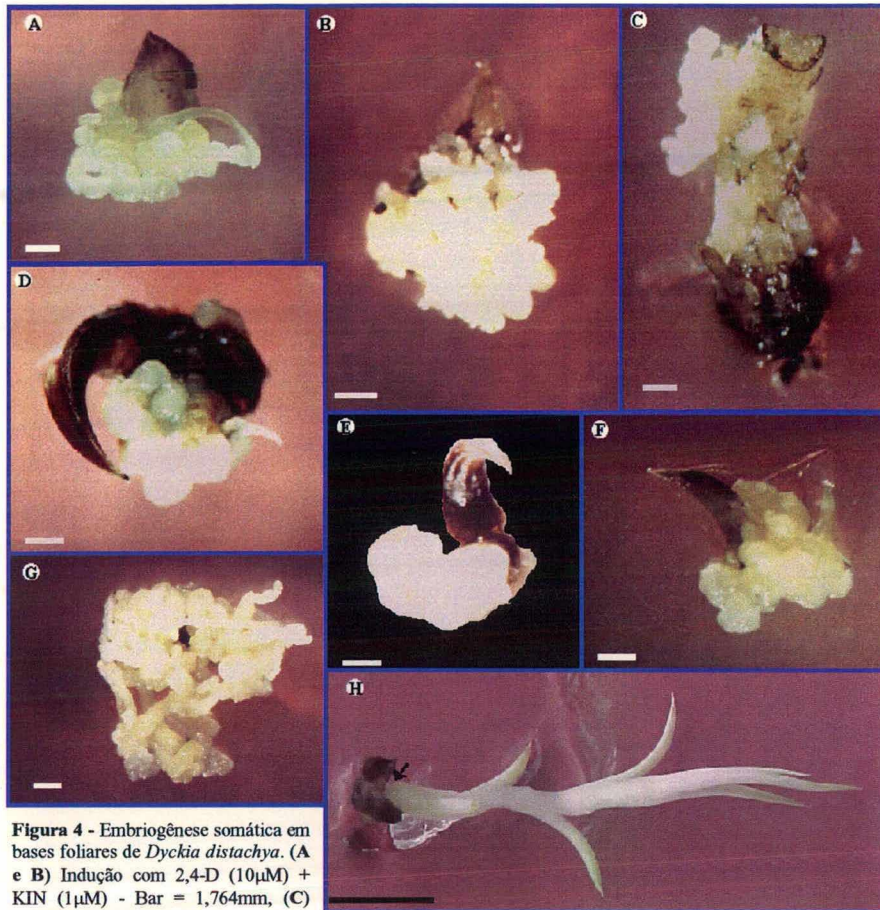


Figura 4 - Embriogênese somática em bases foliares de *Dyckia distachya*. (A e B) Indução com 2,4-D (10µM) + KIN (1µM) - Bar = 1,764mm, (C) indução com 2,4-D (20µM) + KIN (1µM) - Bar = 1,173mm (D) indução com 2,4-D (2,5µM) + Kin (1µM) - Bar = 1,173mm, (E) indução em 2,4-D (5µM) + Kin (1µM) - Bar = 1,764mm, (F) indução com 2,4-D (5µM) + Kin (1µM) - Bar = 2,514mm, (G) indução com 2,4-D (2,5µM) + Kin (1µM), Bar = 1,764mm e (H) controle em MS/0; ver o desenvolvimento da gema axilar com formação de plântula - Bar = 1cm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

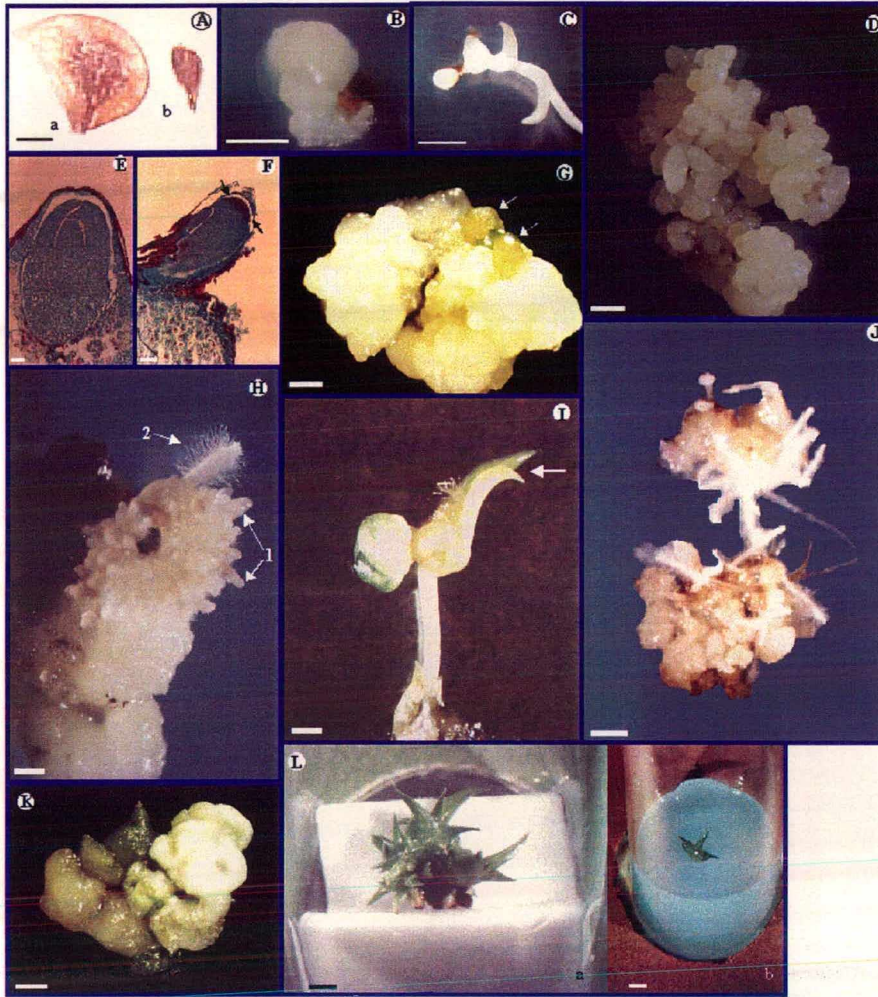


Figura 5 – Embriogênese somática em sementes de *Dyckia distachya*. (A) Semente inoculada (a) com parte alada e (b) após sua remoção - Barra 5mm. (B) Característica dos calos após 30 dias na presença de 2,4-D ($5,0\mu\text{M}$) e (C) em MS/0 - controle - Barras 5mm. (D) Característica das massas celulares após 120 dias da inoculação - Barra 1,764mm. (E) Embrião zigótico em germinação em 2,4-D ($5\mu\text{M}$) - Barra 66,7 μm . (F) Embrião zigótico após 2 dias da inoculação em 2,4-D ($5\mu\text{M}$); perceber que o embrião primeiramente germina e após dá origem a calos demonstrados em B; ver também a alta intensidade mitótica - Barra 88 μm . (G) Cultura embriogênica transferida para a luz na presença de 2iP ($12\mu\text{M}$) + ANA ($0,5\mu\text{M}$), 20 dias após a transferência para a luz; ver princípio de germinação - Barra 0,704mm. (H) Embriões somáticos em estágio torpedo (1) e início de rizogenia (2) - Barra = 0,704mm. (I) Embrião somático de *Dyckia distachya* em germinação; ver a abertura do cotilédone (seta) - Barra = 0,88mm. (J) Cultura embriogênica transferida para PEG e Maltose, após quatro subcultivos; ver a abundante formação rizogênica - Barra = 1,173mm (K) Início da germinação de um embrião somático na presença de 2iP ($12\mu\text{M}$) + ANA ($0,5\mu\text{M}$) 30 dias após a transferência para a luz - Barra 0,88mm. (L) Plântulas convertidas; (a) ainda sobre a ponte de papel e (b) individualizada em meio de cultura geleificado - Barras 1,764mm e 2,514mm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

CAPÍTULO IV
ENRAIZAMENTO E
ACLI MATI ZA ÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As bromélias da subfamília Pitcairnioideae, onde *Dyckia distachya* se inclui, são essencialmente terrestres. Sendo assim, supõe-se que as raízes não sirvam apenas de suporte, ou seja, é possível que elas sejam responsáveis pela absorção de nutrientes do solo. Em observações preliminares, raízes de *Dyckia distachya* visualizadas sob microscopia óptica, mostraram a presença de micorrizas arbusculares (dados não publicados), as quais possivelmente auxiliam na solubilização dos nutrientes do solo que são absorvidos pelas mesmas.

Nos protocolos regenerativos *in vitro* a fase de enraizamento é de suma importância, permitindo o posterior estabelecimento e sobrevivência da planta no campo (Assis & Teixeira, 1999). Entretanto, outros fatores estão envolvidos com a sobrevivência da planta. Malda *et al.* (1999) relataram que um aspecto crucial da micropropagação é o desenvolvimento de plantas capazes de sobreviverem fora dos frascos de cultura. Um dos maiores problemas é que a maioria das plantas derivadas de cultura *in vitro* sofrem dessecação justamente após o transplante, e as vezes isto é fatal durante os primeiros dias de aclimatização.

Em experimento anteriormente realizado (dados não mostrados), brotos micropropagados de *Dyckia distachya*, ao serem aclimatizados sem a indução do enraizamento, apresentaram baixos índices de sobrevivência, sugerindo que as raízes são de suma importância para o sucesso da aclimatização das plântulas micropropagadas. As raízes neste caso também compensariam a perda de água sofrida pelas folhas, as quais ainda não tem um aparato estomático perfeitamente adaptado as condições *ex vitro*.

Na micropropagação de espécies herbáceas, o enraizamento geralmente não constitui um grande problema. Já nas espécies lenhosas, esse processo apresenta dificuldades. Muitos aspectos norteiam a indução, desenvolvimento e crescimento de raízes, e fatores como o genótipo, juvenildade, estresse hídrico, substâncias de reserva, nutrição mineral, condições de crescimento da planta (luz, temperatura), sazonalidade, bem como substâncias reguladoras de crescimento tem apresentado efeitos relevantes no enraizamento (Assis & Teixeira, 1999).

As auxinas suplementadas aos meios de cultura afetam os processos de expansão, alongamento e divisão celular, com reflexos no enraizamento. Entre elas, o ácido naftalenacético (ANA), parece ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*, em concentrações que variaram de 0,1 a 1 mg/L (Krikorian, 1991). Porém, Assis e Teixeira (1999) apontam que a auxina mais utilizada para a promoção do enraizamento é o AIB, embora uma mistura deste com ANA também tem se mostrado eficiente. Na promoção do enraizamento de *Fraxinus angustifolia*, Tonon *et al.* (2001) mostraram que as raízes induzidas com ANA não formaram raízes secundárias, enquanto aquelas induzidas em meio livre dessa auxina possuíam seu sistema radicular normal.

Para a maioria das espécies, a auxina é adicionada na fase de indução das raízes, enquanto que na fase de diferenciação dos primórdios e crescimento das raízes, a presença de auxina no meio de cultura pode inibir o processo (Taiz, 1998).

No processo de indução de raízes muitas outras substâncias podem estar envolvidas. Entre elas as antigiberelinas, tais como paclobutrazol, ancymidol e triadimefon, as quais, por inibirem o alongamento celular, podem promover o enraizamento (George, 1993).

A percentagem de enraizamento em videira decresceu quando as plantas eram deficientes em potássio (42%), fósforo (37%), magnésio (35%) e cálcio (0%), ao passo que a taxa de enraizamento aumentou para 91% quando o nitrogênio estava deficiente (Assis & Teixeira, 1999). Assim, a deficiência de nitrogênio revelou efeito benéfico no enraizamento, enquanto que a deficiência de cálcio apresentou efeito negativo. O zinco, por favorecer a produção de triptofano, precursor natural de AIA, também é importante para o enraizamento. Druege *et al.* (2000) afirmaram que o nitrogênio é elemento importante para a síntese de diversos compostos nitrogenados, sendo também importante para a indução de raízes em brotos micropropagados.

Jarvis (1986) propôs um modelo de indução de raízes adventícias, onde o microelemento boro tem um papel importante no controle do nível endógeno de auxinas. Josten & Kutschera (1999) sugeriram que o boro é requerido nos processos de divisão celular e alongamento celular, e mostraram ainda que microestacas de girassol tratadas com 10 μ M de AIB, mas isentas de boro, não apresentaram formação

de raízes. Na presença de boro, raízes foram induzidas, atingindo 9,4 raízes por explante, mesmo quando nenhuma auxina foi adicionada.

A promoção do enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. Há controvérsias se as raízes induzidas *in vitro* são ou não funcionais. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar as duas formas de indução, bem como estudar o efeito do AIB na indução radicular de brotos micropropagados de *D. distachya*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enraizamento *in vitro*

Esse experimento foi dividido em duas fases: ① adequação da concentração ótima de AIB e ② aplicação deste fitorregulador em diferentes tempos de exposição.

2.1.1. Adequação da concentração ótima de AIB

Brotos de *Dyckia distachya* micropropagados por organogênese direta foram submetidos a diferentes concentrações de AIB (5, 10, 15, 20 e 50 μM) em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) em frascos de 250mL com 30mL de meio de cultura líquido. Passado o período de indução, estes brotos foram subcultivados em frascos com o mesmo meio de cultura da fase de indução, porém gelificado com ágar (0,6%) e isento de AIB. Os brotos permaneceram nestes frascos por mais 30 dias, quando a percentagem de enraizamento, bem como a morfologia das raízes foram avaliados. Cada tratamento foi composto por dois frascos com cinco brotos cada frasco, totalizando 10 brotos por tratamento.

2.1.2. Adequação do tempo ótimo para indução com AIB

Plântulas de *Dyckia distachya* micropropagadas por organogênese direta foram submetidas a diferentes períodos de indução (0, 5, 10, 15 e 20 dias) em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%) e Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e AIB (12,5 μM), em frascos de 250mL com 30mL de meio de cultura em fase líquida. Passado o período de indução, as

plântulas foram transplantadas para frascos contendo o mesmo meio de cultura da fase de indução, porém gelificado com ágar (0,6%) e isento de AIB. As plântulas permaneceram nestes frascos por mais 30 dias, quando a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante e o comprimento das raízes foram avaliados. Cada tratamento foi composto por três repetições, cada uma formada por três frascos com três explantes cada, totalizando 27 plântulas por tratamento. O número e o comprimento das raízes foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e através do programa Statgraph submetidos a análise de variância, ao teste de separação de médias Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) e a Análise de Regressão ($p \leq 0,05$). Após as análises, as plântulas foram plantadas em bandejas alveoladas contendo como substrato uma mistura de xaxim:areia:vermiculita (2:2:1) e transferidas para aclimatização em túnel de nebulização com 50% de redução solar. A cada 30 dias a porcentagem de sobrevivência foi avaliada.

2.2. Enraizamento *ex vitro*

Brotos de *D. distachya* micropropagados por organogênese direta, provenientes do cultivo *in vitro*, foram transferidos para as condições *ex vitro*. Para promover a indução do sistema radicular, as bases dos brotos foram mergulhadas em solução aquosa contendo diferentes concentrações de AIB (0, 50 e 100 μM) em diferentes períodos de indução (0 e 60 minutos). Após, esses brotos foram transplantados para bandejas alveoladas, contendo como substrato uma mistura de xaxim:areia:vermiculita (2:2:1) e transferidos para túnel de nebulização com 50% de redução solar. Cada tratamento foi constituído por 10 brotos, arranjados de forma completamente casualizada, com três repetições. Os dados de porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante e comprimento médio das raízes foram coletados após 60 dias. O comprimento das raízes formadas foi transformado em $\log(x+2)$, enquanto os dados de porcentagem e número de raízes foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos a análise de variância e ao teste de separação de médias Newman-Keuls ($p \leq 0,05$). A cada 30 dias a porcentagem de sobrevivência foi avaliada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Enraizamento *in vitro*

Choque auxínico de 10 dias em AIB (10 ou 15 μM), em meio de cultura basal foram suficientes para induzir o enraizamento em 60% dos brotos (Figura 1A). Brotos induzidos na presença de 10 μM apresentaram um número médio de 1,5 raízes/plântula, enquanto na presença de 15 μM os brotos apresentaram um número médio de 0,9 raízes/plântula (Figura 1B). Observou-se que com o aumento da concentração de AIB, aumentou também a morte das plântulas, podendo atingir até 70% na concentração de 50 μM desta auxina. Os valores obtidos em resposta aos níveis de 10 e 15 μM não diferenciam entre si pelo teste SNK ($p \leq 0,05$). Sendo assim, adotou-se uma média entre estes dois melhores valores, sendo 12,5 μM a concentração de AIB utilizada para os testes de tempo de indução na presença de ácido indolbutírico.

Choque auxínico de 10 dias com AIB (12,5 μM), resultaram na indução do enraizamento de mais de 96% dos brotos (Tabela 1, Figura 2A). Estes brotos apresentaram um número médio de 4,48 raízes/plântula (Figura 2B) e um comprimento médio de 13,42mm (Figura 2C). Entretanto, o ponto máximo foi atingido com choque auxínico de 15 dias, os quais resultaram em taxas médias de enraizamento de 94,44% (Figura 2A), 5,13 raízes/plântula (Figura 2B) e raízes com comprimento médio de 15,34mm (Figura 2C). Choques auxínicos de AIB superiores a quinze dias resultaram na diminuição da percentagem de enraizamento e do número de raízes por broto. Os valores de comprimento foram lineares e contínuos, sugerindo que quanto mais tempo as plântulas ficaram em contato com o meio de cultura mais nutrientes elas puderam absorver e mais puderam crescer.

Para George (1993) a indução do enraizamento de brotos *in vitro*, com elevadas concentrações de auxinas e a posterior transferência para meio de cultura isento de fitorreguladores, possibilita obter os melhores resultados na formação de raízes. Em microestacas de *Acca sellowiana* observou-se 68,9% de enraizamento em resposta a choque auxínico de 6 dias na presença de AIB 20 μM (Oltramari *et al.*, 2000). Gomes *et al.* (2001) obtiveram maior percentagem de enraizamento quando

utilizaram 3mg/L de AIB para o enraizamento de brotos micropropagados de *Salix humboldtiana* Willd.

Alguns autores afirmam que as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, por lhes faltarem pêlos radiculares e conexão vascular e por não desenvolverem um câmbio secundário após o período em cultura. Em experimentos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de morango, Borkowska (2001) observou que o sistema radicular formado *in vitro* consistia em somente raízes principais (sem raízes laterais) sendo elas finas, frágeis e facilmente quebráveis durante a retirada do ágar e plantio no substrato. Entretanto, como foi observado no presente trabalho (Figura 4), raízes de *D. distachya* formadas *ex vitro* também mostraram esse mesmo fenótipo, sendo portanto uma característica não exclusiva do enraizamento *in vitro*.

Debergh & Maene (1981) mostraram que as raízes formadas *in vitro* morrem e que novas são formadas quando transferidas para o campo. Contudo, é possível que as raízes formadas *in vitro* possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas. Este aspecto assume importância no presente trabalho, uma vez que brotos micropropagados de *D. distachya* não sobreviveram a campo quando não possuíam raízes.

O número de raízes e posterior aclimatização não foram influenciados pelo tamanho do explante (Figura 3). Sendo assim, brotos de *D. distachya* com tamanho a partir 1,5cm foram enraizados e aclimatizados com sucesso. Este aspecto permitiu uma redução no tempo de permanência dessas plântulas *in vitro*, reduzindo os custos da micropropagação. A mesma premissa não foi verdadeira para a micropropagação de abacaxi. Guerra *et al.* (1999a) e Dal Vesco *et al.* (2001a) afirmam que boas percentagens de enraizamento e sobrevivência de brotos micropropagados de abacaxi só foram possíveis quando empregadas plântulas maiores do que 3 e 7cm, nos dois trabalhos, respectivamente. Para abacaxi, o tamanho das plântulas a serem aclimatizadas parece ser fundamental para o sucesso da micropropagação, sendo que brotos inferiores de 3cm têm baixas taxas de sobrevivência (Costa & Zafari, 2001).

Ainda segundo Guerra *et al.* (1999a) a percentagem de 95,5% de sobrevivência de plântulas micropropagadas de abacaxizeiro foi obtida quando os brotos foram mantidos em fitotron com temperatura e luminosidades controladas. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos no presente trabalho, no qual a

aclimatização se deu no campo, em túnel de nebulização e com 92,62% de sobrevivência após 120 dias.

3.2. Enraizamento *ex vitro*

Mais de 79% dos brotos transferidos diretamente para substratos formaram raízes (Tabela 2). A percentagem de enraizamento e o tamanho das raízes formadas *ex vitro* foram levemente influenciados pelo AIB, enquanto para o número de raízes, este fitorregulador resultou em uma redução no número de raízes por broto. Os valores obtidos não diferiram entre si pelo teste SNK ($p \leq 0,05$). Essa taxa de enraizamento pode ser considerada elevada se comparada aos valores de 31,6% de enraizamento obtidos por Duarte *et al.* (1992) em estacas de *Acca selowiana* em resposta ao AIB (5.000ppm), sendo contudo, inferior àquela obtida por Oltramari *et al.* (2000) para o enraizamento dessa mesma espécie usando 100 μ M de AIB.

Para Pasqual & Lopes (1991), microestacas de *Pyrus calleryana* revelaram 100% de enraizamento quando submetidas ao AIB (30mg/L) por 24 horas. Já em estacas de *Psidium guajava* (Coelho *et al.*, 2001), não se obteve mais do que 70% de enraizamento mesmo com a aplicação exógena de AIB 300mg/L. Habbermann *et al.* (2001) descreveram que a melhor taxa enraizamento de estacas de laranja doce foi com o uso de 5.000mg/L de AIB adicionado de 2.000mg/L de PBZ.

Para o porta enxerto de macieira Marubakaido, a percentagem de enraizamento e a sobrevivência das plantas não foram estatisticamente diferentes, quando as microestacas foram tratadas *in vitro* e *ex vitro* com AIB (Martins & Pedrotti, 2001). Ainda segundo estes autores, o enraizamento *ex vitro* é mais eficaz, pois a passagem direta para substratos minerais elimina o processo de retirada de resíduos de meio de cultura do sistema radicular, o que contribui para diminuir a contaminação das plantas no estágio de aclimatização, reduzindo custos com mão-de-obra e instalações. Os dados do autor acima são diferentes dos encontrados nesse trabalho, onde apenas 76% das plantas induzidas sobreviveram após 150 dias comparando com 93,62% de sobrevivência das plantas induzidas ao enraizamento *in vitro*.

Como já descrito anteriormente, raízes de *D. distachya* formadas *ex vitro* foram poucas e frágeis (Figura 4), fato este que dificultou muito a retirada das

plantas do substrato para que as mesmas fossem medidas e contadas. Já as raízes formadas *in vitro* apresentaram-se em maior número e mais grossas (figura 3).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a indução do enraizamento dos brotos maiores que 1,5cm deve ser feito *in vitro* com o emprego de AIB. As raízes formadas em resposta a estes procedimentos são mais robustas e em maior quantidade, o que pode permitir uma maior sobrevivência *ex vitro*. Mesmo considerando a taxa de 85% de enraizamento *ex vitro* dos brotos micropropagados, sua eficácia não pode ser considerada boa tendo em vista o baixo número de raízes formadas e a baixa sobrevivência das plantas.

Tabela 1 - Enraizamento, número e comprimento das raízes de *Dyckia distachya* em função do tempo de exposição ao AIB (12,5µM) na fase de indução *in vitro*, após 30 dias de expressão em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) gelificado com ágar (0,6%). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Dias de indução	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (mm)
Controle (0 dia)	62,96 B	1 B	6,7 B
5 dias	92,59 A	3,55 B A	9,71 B A
10 dias	96,30 A	4,48 A	13,42 B A
15 dias	94,44 A	5,13 A	15,34 A
20 dias	93,52 A	5,65 A	17,50 A
CV (%)	24,38	18,62	13,38

Tabela 2 - Efeito do AIB (0, 50 e 100µM) em brotos micropropagados de *Dyckia distachya* induzidas *ex vitro* por 60 minutos sobre a porcentagem de enraizamento, número médio e comprimento das raízes, 60 dias após a transferência. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK $P \leq 0,05$). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Tratamento	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (mm)
Controle (água)	81,94 A	2,51 A	18,24 A
AIB (50µM)	79,37 A	1,90 A	25,54 A
AIB (100µM)	85,19 A	1,53 A	26,71 A
CV (%)	12,31	29,05	20,04

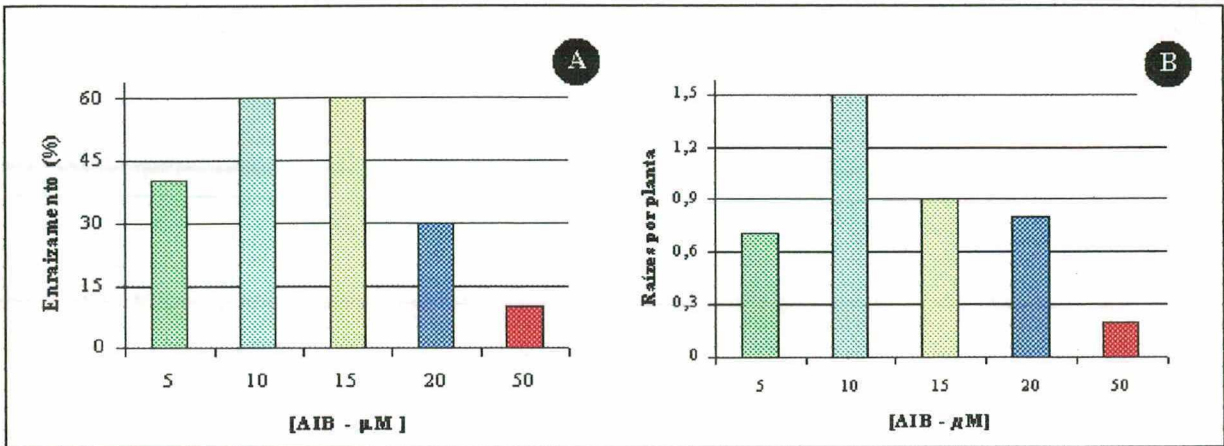


Figura 1 - Indução de enraizamento *in vitro* em brotos de *Dyckia distachya* com diferentes concentrações de AIB adicionado ao meio de cultura líquido MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 dias após a indução e expressão em MS/0 gelificado com ágar (0,6%). (A) Porcentagem de enraizamento e (B) Número de raízes/plântula. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

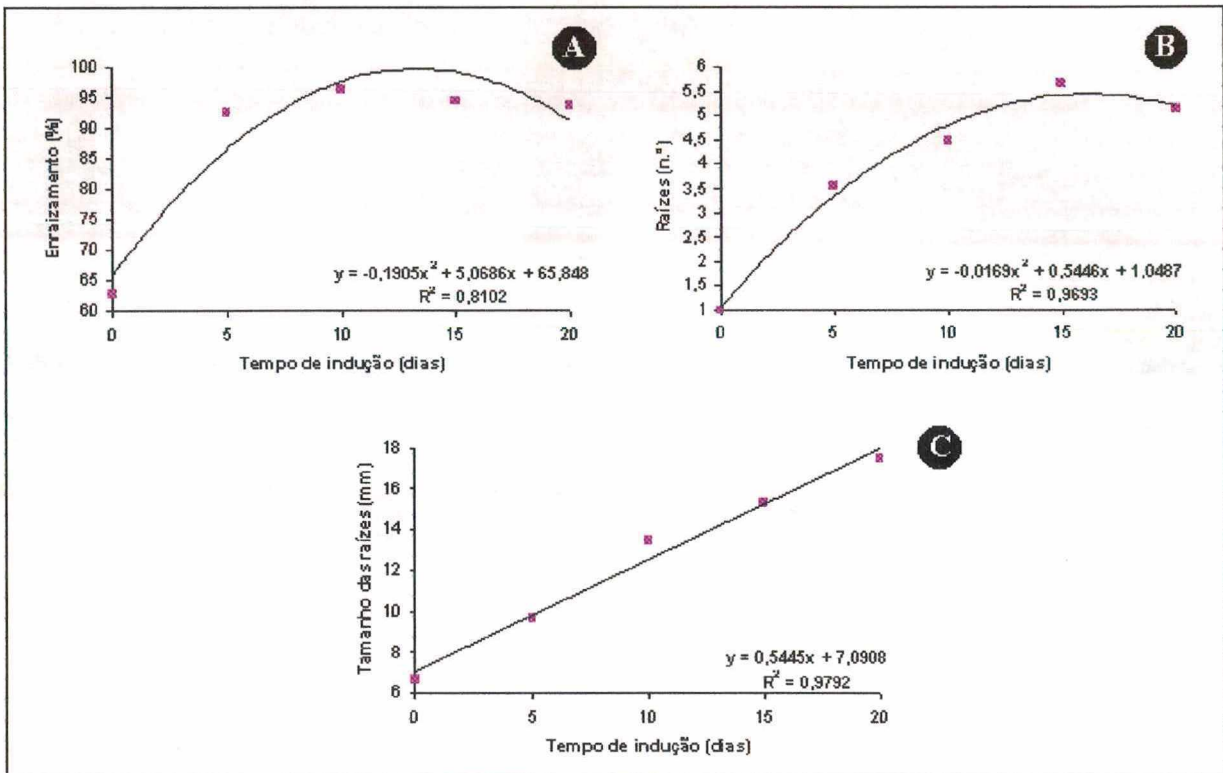


Figura 2 = Análise de regressão para o potencial de enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dyckia distachya* cultivadas *in vitro*. (A) porcentagem de enraizamento, (B) número de raízes e (C) comprimento médio das raízes em função do tempo de indução (0, 5, 10, 15 e 20 dias) em AIB 12,5µM, adicionado ao meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 dias após a indução. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

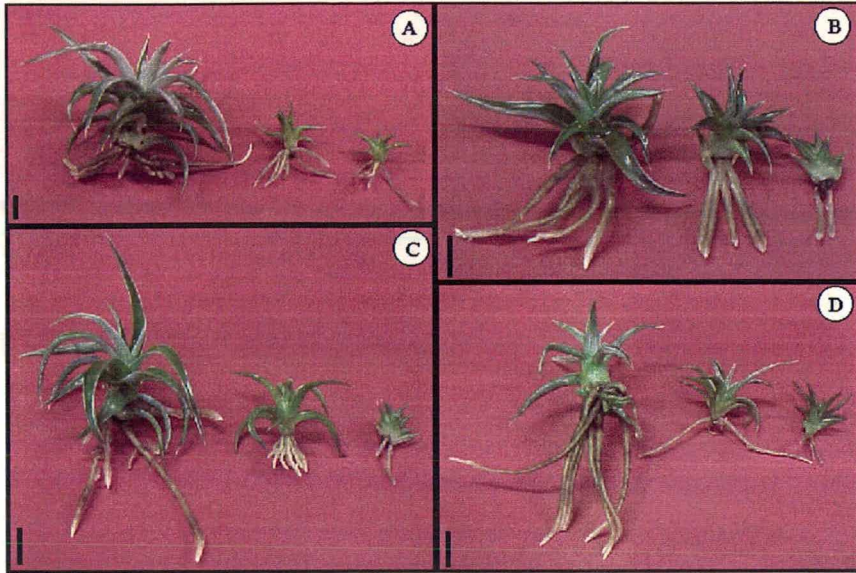


Figura 3 - Indução do enraizamento *in vitro* de *Dyckia distachya* em meio de cultura MS suplementado com AIB ($12,5\mu\text{M}$) após 30 dias de alongamento das raízes. (A) Quinze dias de indução, e (B, C e D) Vinte dias de indução. Observar a grande quantidade de raízes e a espessura das mesmas. Barras 1cm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

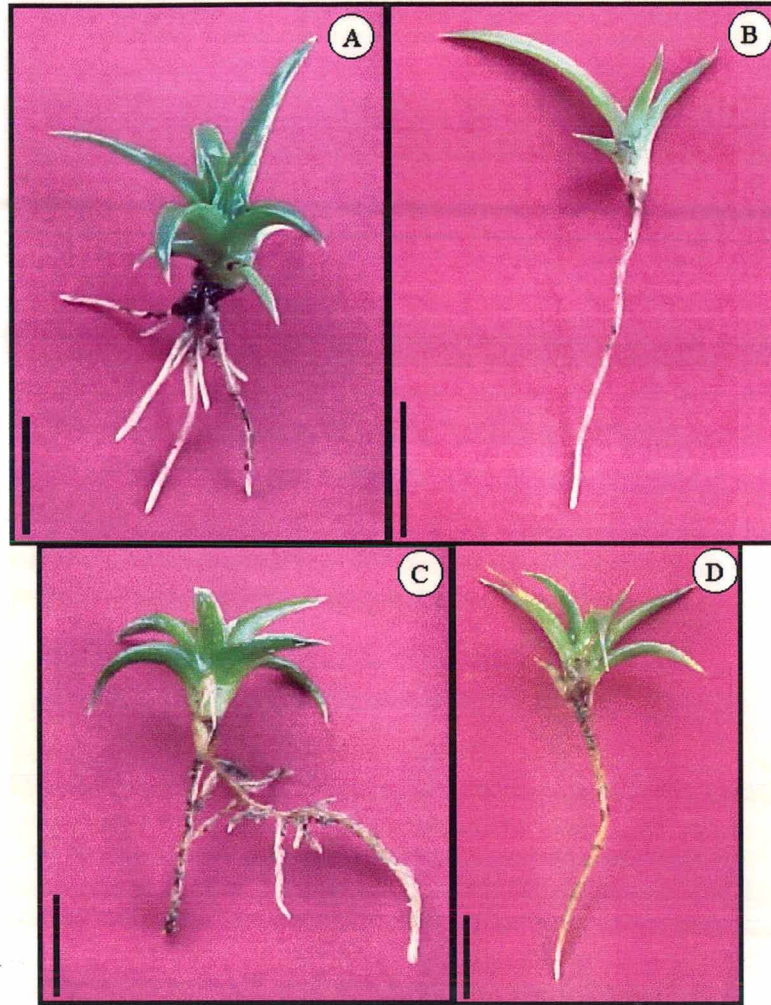


Figura 4 - Indução do enraizamento *ex vitro* de brotos de *Dyckia distachya* após 60 dias em túnel de nebulização. (A) Planta controle sem indução com AIB, (B) Indução com 50 μ M de AIB por 60 minutos; observar a formação de raiz única, (C) Indução com 100 μ M de AIB por 60 minutos e (D) Indução com 100 μ M de AIB por 60 minutos; observar a formação de raiz única. Barras 1cm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

CAPÍTULO V
CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As florestas tropicais são o berço de dois terços das espécies terrestres (Pimm *et al.*, 2001) e o Brasil é o principal país entre os detentores de megadiversidade, possuindo entre 15 e 20% do número total de espécies (Heringer & Montenegro, 2000).

Entretanto, os lugares mais notáveis da Terra e detentores desta megadiversidade também são os que mais devastam seus recursos naturais. A combinação entre maior biodiversidade com seu grau de ameaça, gerou o conceito de ‘hotspots’, os quais, em número de vinte cinco, estabelecem ao redor do mundo as áreas prioritárias de conservação desta biodiversidade.

Segundo Cincotta *et al.* (2000), os 25 ‘hotspots’ existentes concentram espécies endêmicas vulneráveis à extinção, em decorrência da destruição dos habitats regionais. O endemismo da flora é o critério básico para classificar um ‘hotspot’ porque as plantas suportam a maioria das outras formas de vida por sua habilidade de aproveitar e transformar a energia do sol. O Brasil é o centro de um dos maiores e mais ameaçados ‘hotspots’ do mundo – a Mata Atlântica (Figura 2A) (www.conservation.org).

A Mata Atlântica estende-se por toda a costa brasileira, de nordeste a sul do país, penetrando em parte no Paraguai e Argentina. Esta floresta e seus ecossistemas associados cobriam, na época do descobrimento, 1.227.600km². Atualmente, apenas 7,5% da área deste bioma mantém suas características bióticas originais. Destes remanescentes, apenas 35,9% são de áreas protegidas. Neste ‘hotspot’ estima-se a existência de aproximadamente 20.000 espécies de plantas e 2,7% da flora endêmica do mundo (Myers *et al.*, 2000). E, apesar da devastação a que foi submetida, a Mata Atlântica abriga ainda altíssimos níveis de riqueza biológica e endemismos (Heringer & Montenegro, 2000).

Aproximadamente 20% da população mundial (1,1 bilhões de pessoas) viviam, em 1995, nas áreas destes ‘hotspots’ e as estimativas indicam que esse número vem aumentando numa escala de 1,8% ao ano, valor este bem maior do que as taxas de crescimento observadas em outras partes do mundo, que crescem em taxas média de 1,3% ao ano (Cincotta *et al.*, 2000). Os levantamentos indicam que

2.528 municípios estão totalmente inseridos na Mata Atlântica, ou seja, 46% do total de municípios do Brasil. Santa Catarina é um Estado que encontra-se totalmente inserido no âmbito da floresta, revelando apenas 18,06% de remanescentes florestais (Figura 2B) (www.sosmatatlantica.org.br).

No pouco que resta dessa Mata, existem 8 mil espécies endêmicas; isto quer dizer que, de todos os vegetais do mundo, 2,7% nascem única e exclusivamente na Mata Atlântica (www.conservation.org). A cada ano, estima-se que 13 milhões de hectares de florestas são destruídas, levando ao desaparecimento entre 14.000 a 40.000 espécies (Kremen *et al.*, 2000).

Ao se derrubarem as florestas o solo sob estas é logo degradado e abandonado ou então podem ser usados para a agricultura e a criação de gado (Pimm *et al.*, 2001; Kremen *et al.*, 2000). Geralmente aqueles que destroem a biodiversidade o fazem porque estão deslocados, marginalizados, sem alternativas, ou ainda o fazem para a obtenção de lucro em curto prazo (Cincotta *et al.*, 2000)

Das atividades que o Estado de Santa Catarina desenvolve, duas possuem grande importância econômica e têm grandes impactos sobre a floresta. A agropecuária, constituída basicamente pela criação de gado, aves e suínos, demanda grandes áreas de campo. Outra atividade de impacto sobre os remanescentes florestais no Estado é o amplo potencial de geração de energia hidroelétrica, o que dá ao mesmo a possibilidade de construir diversas usinas ou mesmo barragens.

As bromélias são espécies secundárias na mata, sendo assim, com a devastação das florestas, essas plantas também são afetadas. Segundo Heringer & Montenegro (2000), o oeste do Estado de Santa Catarina possui áreas pouco conhecidas, mas de provável importância biológica (Figura 2C). É exatamente no oeste deste Estado que se encontra o centro de origem da bromélia *Dyckia distachya* (Reitz, 1983). Entretanto, com a devastação da mata e a construção da UHI e outras em projeto, sua sobrevivência será bastante improvável, uma vez que, ao longo do rio Paraná esta espécie já desapareceu completamente. Em virtude da formação do lago da barragem de Itaipú que cobriu toda a área das margens rochosas deste, pequenos agrupamentos, sobretudo no lado do Paraguai, ficaram submersos.

As espécies de *Dyckia* são altamente endêmicas, provavelmente como consequência da produção de sementes que não induzem os potenciais agentes de dispersão, a qual restringe-se apenas a dispersão anemófila (Benzing & Stiles, 1998).

A conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um tema de grande importância. Enquanto muitas espécies estão em risco de extinção nas regiões temperadas, várias espécies desaparecem todos os dias nos trópicos. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto, uma questão prioritária. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas nos trópicos, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualísticas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (Park *et al.*, 1998).

Para Harding *et al.* (1997) as técnicas de conservação *in vitro* podem se constituir num meio valioso para a conservação de recursos genéticos vegetais. Entretanto, Withers & Williams (1999) afirmam que a manutenção de culturas *in vitro* é cara e inconveniente; as culturas são vulneráveis à perda acidental por contaminação microbiana, acidentes ou falhas nos equipamentos, mas mesmo assim é uma técnica de grande potencial de aplicação. Por outro lado, a manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo tem como sua principal desvantagem sua vulnerabilidade. As plantas são expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas ou ao vandalismo, podendo ser perdidas por falhas na identificação ou erros humanos. Aliado a isso, a manutenção *in vivo* é onerosa, podendo ser paralisada em períodos de dificuldade econômica. Sendo assim, a possibilidade de conservação *in vitro* é atraente tanto por motivos econômicos quanto práticos.

Withers & Williams (1999) concordam com a conservação de germoplasma *in vitro*, mas salientam que a conservação *in situ* é a forma de conservação mais barata que existe, sendo realizada no local onde as plantas e seus progenitores imediatos estão crescendo. A conservação *in situ* prioriza a proteção do habitat, permitindo a contínua evolução de espécies e a manutenção das diversidades intra e inter-específicas de populações, indivíduos e genes. Para a maioria das espécies nativas não existem, ainda, métodos estabelecidos para a conservação *in situ* e *ex situ*, porque não se conhecem seus mecanismos de reprodução, crescimento e de interação com o meio ambiente.

Entretanto, quando se pretende conservar uma espécie por longos períodos, deve-se considerar todos os métodos de conservação existentes. Tecidos vegetais, se conservados por muito tempo, podem perder suas características iniciais, tanto pela utilização de fitorreguladores, quanto pela utilização demasiada de nutrientes nos meios de cultura, bem como por deixar a planta “preguiçosa” pois a mesma estará vivendo sempre em heterotrofismo. Segundo Yin (1999), sementes podem ser armazenadas preservando suas características iniciais por tempo indefinido, principalmente se forem criopreservadas. De acordo com Benson *et al.* (1998), os bancos de sementes ainda se constituem no principal meio de conservação de germoplasma de plantas agricultáveis.

O Banco Interamericano para o Desenvolvimento produziu um relatório no qual lembra que ‘Biotecnologia sem biodiversidade é uma mera especulação acadêmica’. Sendo assim, a proposta da biotecnologia da conservação é complementar e não substitui os métodos de preservação natural, podendo, ainda, contribuir para a preservação de plantas ameaçadas de extinção.

A dinâmica da destruição da floresta resultou, segundo Heringer & Montenegro (2000), em sérias alterações para os ecossistemas que compõem o bioma, devido, em particular, à alta fragmentação do habitat e perda de sua biodiversidade. Devido a isto e aliado ao forte endemismo de *Dyckia distachya*, faz-se necessário e urgente, o estabelecimento de programas de conservação de germoplasma. Assim, no presente trabalho foram avaliados métodos *ex situ* e *in vitro* visando à conservação desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de plantas e banco de germoplasma *ex vitro*

Uma faixa de aproximadamente 500 metros de comprimento da margem do Rio Uruguai foi vasculhada a procura dos remanescentes de *Dyckia distachya*. Aproximadamente a cada 30 metros uma população de *Dyckia* foi avaliada e dela foram retiradas três ou quatro plantas, as quais foram transportadas para o Bromeliário do LFDGV. Todas as plantas foram plantadas em vasos plásticos ou de barro contendo uma mistura de xaxim:vermiculita:areia (2:2:1) e armazenadas sob telado com 40% de redução de luminosidade.

2.2. Banco de Germoplasma *in vitro*

2.2.1. Teste de Germinação

Sementes foram coletadas nos meses de novembro a janeiro de 1999 e 2000 no banco de germoplasma *in situ* da UHI, transportadas até o LFDGV e armazenadas sob refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 12 meses. No mês de fevereiro de 2001, as sementes foram selecionadas e mergulhadas em água destilada com a adição de cinco gotas de detergente comercial e enxaguadas três vezes para uma prévia desinfestação. Após esse procedimento, em condições de CFL, foram mergulhadas em álcool 70% por 3 minutos, seguido por um mergulho em alvejante comercial (5% de NaOCl) e por cinco enxágues com água esterilizada, conforme protocolo estabelecido por Mercier & Kerbauy (1993). Após a desinfestação, as sementes, com sua parte alada removida, foram inoculadas em placas de Petri contendo 30mL de meio de cultura.

Foram testadas cinco formulações salinas para a verificação da percentagem de germinação: KC (pH 4,5), KC (pH 5,8), MS/0, MS/2, MS/3. Todos os meios de cultura foram suplementados com açúcar cristal comercial (2% para o meio KC e 3% para o meio MS) mais Vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e gelificados com ágar (1,0% para o meio KC pH 4,5 e 0,6% para os demais). Cada tratamento foi composto por três repetições com quatro placas cada, onde foram inoculadas 10 sementes em cada, constituindo 120 sementes por tratamento.

Para se testar o efeito da armazenagem na viabilidade das sementes, realizou-se previamente um teste de germinação, onde as sementes foram coletadas e prontamente germinadas em meio de cultura KC pH 4,5 gelificado com ágar (1,0%).

Após o ajuste do pH, os meios de cultura foram autoclavados por 15 minutos à 121°C e 1,5atm e plaqueados. Após 30 dias de cultivo avaliou-se a percentagem de germinação em cada meio de cultura. Os dados foram então submetidos a ANOVA e Teste de Separação de Médias (SNK $p\leq 0,05$).

2.2.2. Manutenção das culturas *in vitro*

Após a avaliação da percentagem de germinação, todas as plântulas resultantes foram então divididas em dois grupos: ① individualmente ou em duplas foram repicadas para tubos em ensaio (100 x 15mm), com a adição de 5mL de meio de

cultura KC pH 4,5, gelificado com ágar (1,0%) e ② em grupos de 10 para frascos de 500mL com 30mL do mesmo meio de cultura acima, porém em fase líquida. A cada 90 dias as plântulas foram avaliadas e repicadas para os mesmos meios de cultura para a manutenção do banco de germoplasma. As culturas foram manipuladas sob condições assépticas em CFL, e sua manutenção deu-se em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR) de $60\pm 5\%$, $60\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ de fótons de luz e fotoperíodo de 16 horas.

2.3. Banco de Sementes

Sementes de *Dyckia distachya* foram coletadas nos meses de outubro a dezembro de 1999 e 2000 no banco de germoplasma *in situ* da UHI e nos meses de novembro a janeiro (2001-2002) no bromeliário do LFDGV. As sementes foram selecionadas, secas em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ e armazenadas em tubos de polietileno de $\pm 30\text{mL}$ contendo 1g de fungicida Benlate[®] para prevenir o ataque de fungos e armazenadas sob refrigeração de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coleta de plantas e banco de germoplasma *ex vitro*

Dyckia distachya é uma bromélia que por não produzir frutos atrativos à maioria das espécies animais, não tem uma boa forma de dispersão de suas sementes, restringindo-se apenas a dispersão anemófila. Devido a isso e a grande produção de afilhos, essa bromélia forma densos agrupamentos em torno de si. Muitos desses agrupamentos são originários do desenvolvimento do próprio afilho ou da germinação das sementes que caem próximo à planta mãe (Figura 3B e C).

Não é novidade que represas para a instalação de usinas hidroelétricas transformam drasticamente a fisionomia natural das regiões onde elas se instalam (Leme, 1996). Sendo assim, nos primeiros dias do mês de janeiro de 2000, época de pouca vazante (Figura 3A), o Rio Uruguai teve aproximadamente 500m de sua margem vasculhada, sendo que foram coletados no mínimo três exemplares de cada população, em 15 populações, totalizando no mínimo 45 plantas.

As plantas foram acondicionadas em caixas de papelão e fechadas para transporte por via rodoviária até o LFDGV-CCA/UFSC. Essas plantas foram então identificadas com um código, indicando o número da população e o número da planta de onde ela foi retirada (Figura 3G). Procedeu-se então o plantio em vasos plásticos ou de barro contendo uma mistura de xaxim:vermiculita:areia (2:2:1) e as plantas foram então acondicionadas sobre bancada acanalada sob telado com redução de 40% da intensidade luminosa (Figura 3D). Desde a chegada das plantas já ocorreram duas florações (Figura 3E), em 2000 e 2001, indicando que as mesmas foram completamente aclimatadas no novo ambiente.

Segundo Luther (1994) a conservação de germoplasma *ex situ* deve ser encorajada, significando uma forma de seguro contra a extinção da espécie provocada por catástrofes, tanto de origem naturais como as provocadas pelo homem com a instalação de barragens e/ou usinas hidroelétricas.

3.2. Banco de germoplasma *in vitro*

3.2.1. Teste de Germinação

Após 1 ano de armazenamento, 60% das sementes inoculadas em meio de cultura KC (Knudson, 1946) com pH 4,5 germinaram (Figura 1). Este valor não foi estatisticamente diferente (SNK $p \leq 0,05$) do valor encontrado para a germinação em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) diluído a um terço (55,83%), entretanto foi diferente dos demais tratamentos, inclusive do tratamento com meio KC com pH 5,8, o qual obteve o mais baixo valor (29,17%). O fato do pH 4,5 ter se mostrado melhor do que o pH 5,8, usualmente utilizado em cultura de tecidos, é perfeitamente compreendido quando se analisa que o habitat original dessa bromélia encontra-se no leito rochoso do rio Uruguai (Figura 3B e C). Sendo assim, é possível que a rizosfera dessas plantas tenha a capacidade de reduzir o pH do solo para que juntamente com micorrizas, já encontradas ali, possam solubilizar melhor os escassos nutrientes.

O estudo da germinação e dormência de sementes de interesse mundial tem sido alvo de recentes pesquisas devido a complexidade dos eventos envolvidos nestes dois processos. Bewley (1997) revela que aproximadamente 5000

publicações referentes a germinação e 700 sobre a dormência de sementes foram editadas nas últimas décadas.

Por definição, a germinação incorpora eventos que iniciam com a via de captação de água pelas sementes maduras e termina com o alongamento do eixo embrionário. O sinal visível de que a germinação está completa é geralmente o surgimento das estruturas que circundam o embrião, sendo geralmente a radícula a primeira estrutura a aparecer (Bewley, 1997). No entanto, quando a germinação de *Dyckia distachya* é observada macroscopicamente e microscopicamente sob cortes histológicos (ver Capítulo III – Figura 5-F), a primeira estrutura visível é o cotilédone, seguindo então a radícula. Sendo assim, para a análise da germinação aos 30 dias foi considerado como germinada toda semente que tinha seu cotilédone aparente sobre o meio de cultura.

Quando analisamos o efeito da armazenagem sobre a viabilidade das sementes percebe-se que esta foi diretamente afetada pelo período de armazenamento, visto que as mesmas quando germinadas tão logo coletadas, mostram uma viabilidade em torno de 75% (resultados não mostrados). Mesmo com isso, e se analisarmos que as sementes foram armazenadas em geladeira sob refrigeração de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, uma queda de aproximadamente 15% em 1 ano de estocagem pode ser considerada satisfatória.

Aliado a esta boa viabilidade, é importante salientar que no interior de cada fruto encontram-se aproximadamente 60 sementes e que uma planta adulta pode produzir em média 10-15 frutos, o que poderia fornecer uma quantidade satisfatória de sementes a cada ano, para os processos de iniciação de culturas e conservação de germoplasma *in vitro*.

3.2.1. Manutenção das Culturas *in vitro*

As plântulas que germinaram, foram repicadas individualmente ou em duplas para tubos de ensaio contendo meio de cultura KC/0 pH 4,5 gelificado com ágar (1,0%) (Figura 4B e C) ou para frascos contendo 10 plântulas em meio líquido (Figura 4E) sendo então subcultivadas a cada 90 dias para manutenção do banco de germoplasma *in vitro*.

O banco de germoplasma *in vitro* é composto atualmente de 50 tubos de ensaio contendo duas plântulas cada, mais 15 frascos de 500mL contendo 10

plântulas cada um, totalizando mais de duzentos e cinquenta genótipos diferentes. As culturas são mantidas em condições fáceis de manipular, podendo, a qualquer tempo, serem utilizadas para multiplicação massal ou troca de germoplasma com outras instituições.

3.3. Banco de sementes

As sementes coletadas nos meses de outubro a dezembro (1999-2001) no Banco de Germoplasma *in situ* da UHI e/ou no Banco de Germoplasma *ex situ* do LFDGV-CCA/UFSC foram acondicionadas em tubos de polietileno contendo 1g de Benlate® para prevenir o aparecimento de fungos. Os tubos foram identificados (Figura 4D) e armazenados sob refrigeração de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Com esse trabalho percebeu-se que há boas vantagens de se conservar germoplasma *in vitro*; além de otimizar tempo e espaço, as culturas estão livres do ataque de patógenos e da pressão exercida sobre os ambientes nos quais ela se insere. Outra vantagem dos Bancos de Germoplasma *in vitro* é facilitar o intercâmbio de material vegetal entre instituições. Sendo assim, as técnicas empregadas no presente trabalho para o estabelecimento de um Banco de Germoplasma *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, revelam o potencial de emprego destas técnicas para a conservação desta espécie.

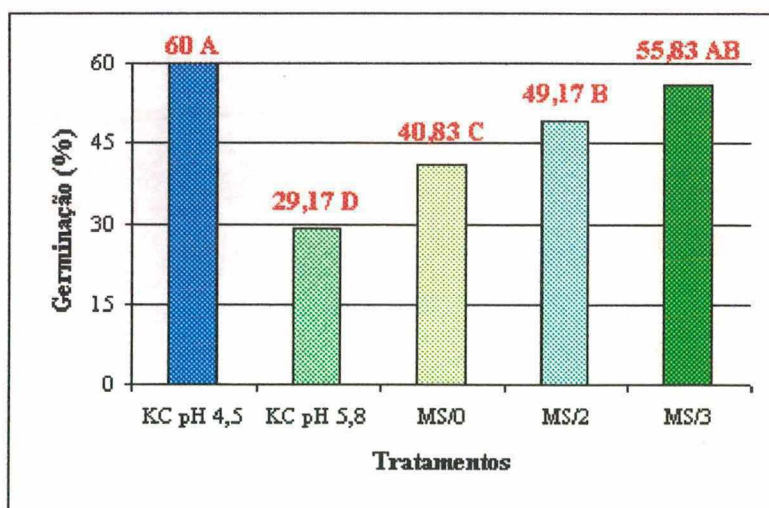


Figura 1 = Percentagem média de germinação de sementes de *Dyckia distachya* sob diferentes formulações salinas, após 30 dias de cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

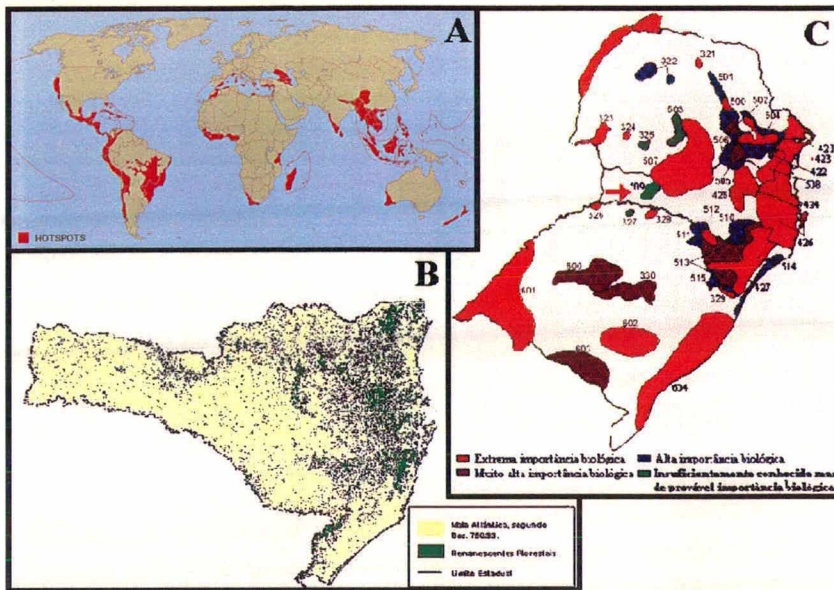


Figura 2 = A. Os hotspots de biodiversidade do mundo (ver a ampla extensão do hotspot da Mata Atlântica no Brasil). B. Domínio da Mata Atlântica no Estado de Santa Catarina (ver os poucos remanescentes ainda existentes no Estado). C. Áreas problemáticas ou carentes de estudo nos Estados da Região Sul do Brasil (ver que a região de endemidade de *Dyckia distachya* é uma área insuficientemente estudada). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

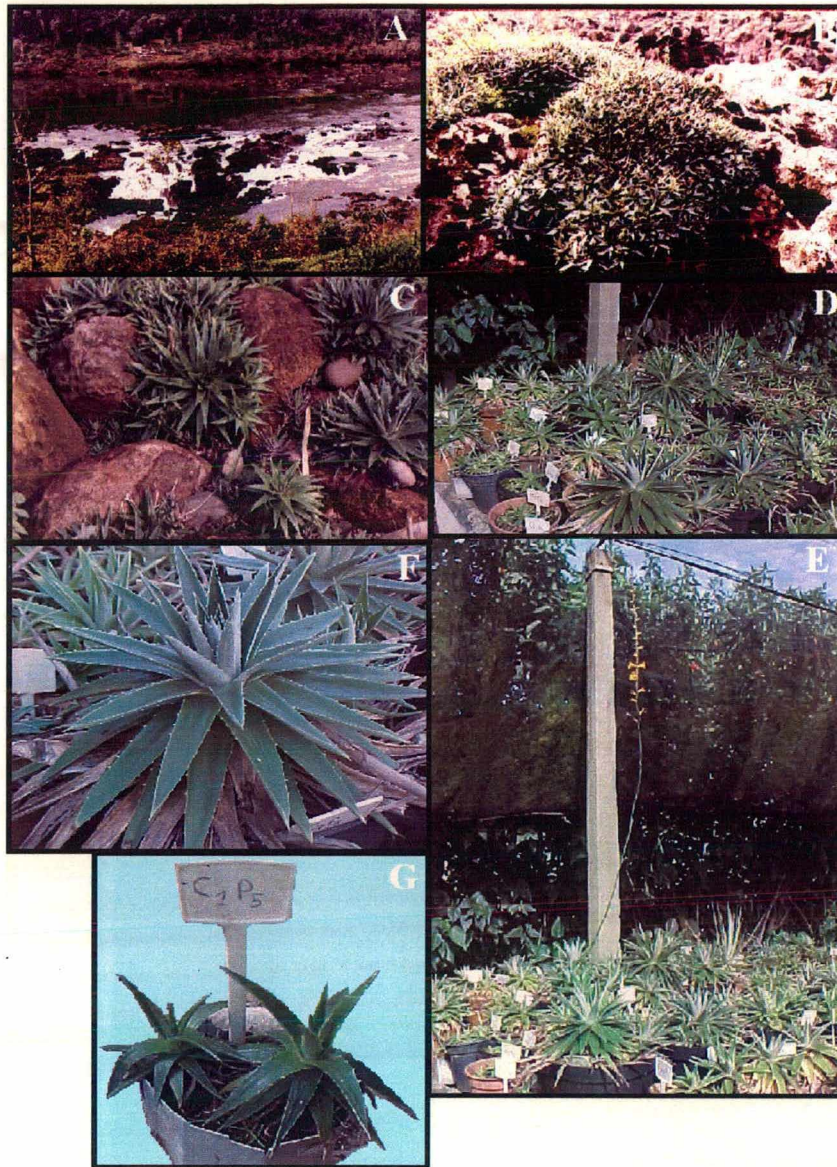


Figura 3: A. Visão geral do Rio Uruguai, próximo ao estreito de Augusto César. B. Colônias de *Dyckia distachya* encontradas na beira do rio, onde foram coletadas as plantas para o banco de germoplasma *ex situ*. C. Plantas entremeadas nas rochas no leito do rio (perceber no centro a grande produção de afillhos). D. Banco de germoplasma *ex vitro* do Bromeliário do LFDGV. E. Visão geral do banco de germoplasma, evidenciando uma planta em florescimento. F. Detalhes de uma planta de *Dyckia distachya*. G. Sistema de classificação das plantas coletadas; (C significa o número da colônia e P o número da planta). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

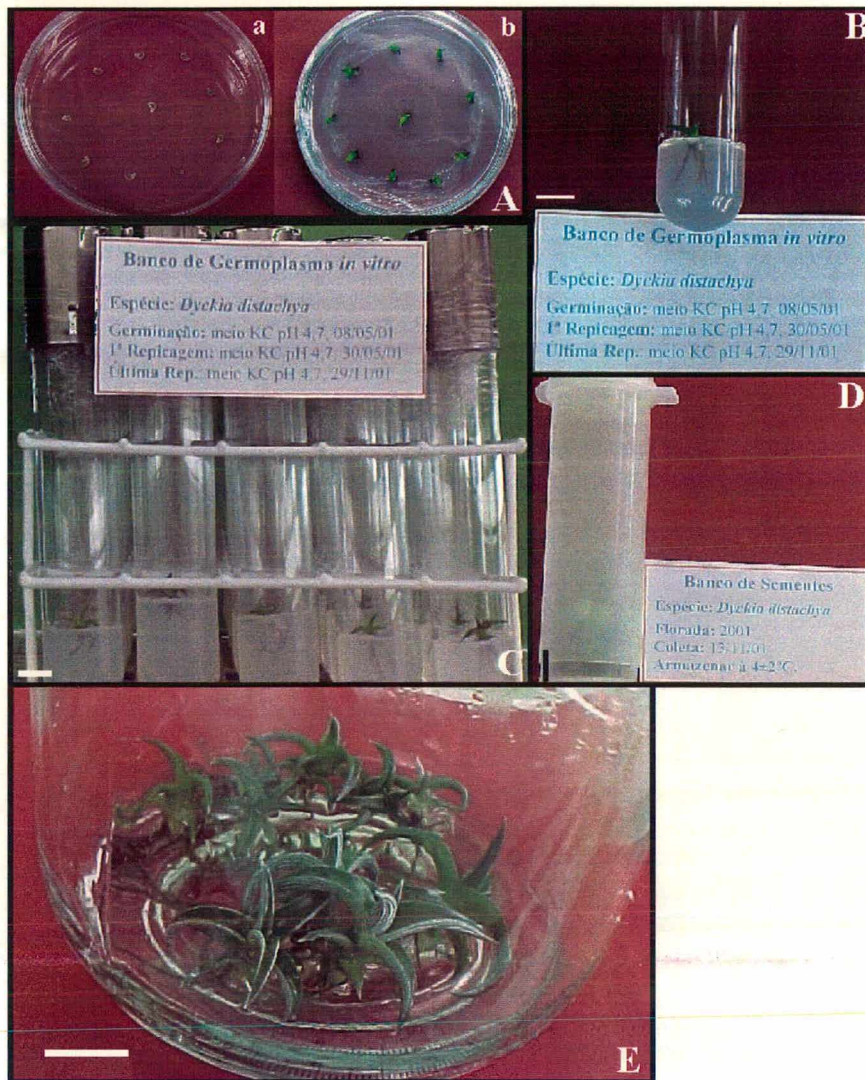


Figura 4: Banco de Germoplasma *in vitro*. **A.** Introdução das sementes: inoculação (a) e (b) germinação após 30 dias. **B e C.** Banco de germoplasma em meio solidificado com ágar - visão dos tubos em geral da estante. **D.** Banco de sementes. **E.** Banco de germoplasma em frascos com meio líquido. Barra = 1cm. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- 1) Quando se utilizou sementes para induzir organogênese direta em *Dyckia distachya* 78,93 brotos por grama foram obtidos em meio de cultura suplementado com BAP (20 μ M). Ainda neste sistema, foram obtidos 20,30 brotos por explante na presença de BAP (1 μ M) após 120 dias de cultivo. BAP mostrou-se sensivelmente melhor do que a citocinina KIN. Quando plântulas foram utilizadas nos processos de micropropagação, obteve-se 133,58 brotos por explante na presença de ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (6 μ M) em fase líquida. 72,94 brotos por grama foram obtidos na presença de ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) + PBZ (6 μ M) em meio de cultura gelificado com ágar. O meio de cultura líquido mostrou-se superior ao meio de cultura gelificado, levando em conta a taxa de multiplicação, a facilidade de manuseio das culturas e o custo do processo.
- 2) Boas taxas de indução de embriogênese somática foram alcançadas com a utilização de sementes maduras de *Dyckia distachya*. Percentagens acima de 59% de indução e formação de mais de 160 embriões por placa puderam ser observados quando embriões zigóticos foram inoculados na presença de Picloram (5 μ M) + KIN (1 μ M). Resultados bem inferiores foram alcançados em meios de cultura suplementados com 2,4-D, onde valores de 39,48% de indução e formação de 65,92 embriões por placa foram observados.
- 3) Brotos micropropagados ao serem enraizados *in vitro* mostraram percentagens de enraizamento superiores a 94% quando induzidos com AIB (12,5 μ M). Neste, as plântulas formaram em média 5,13 raízes por plântula com comprimento médio de 15,34mm. O tamanho do explante utilizado não foi influenciado pelos tratamentos e brotos maiores que 1,5cm puderam ser enraizados e aclimatizados com sucesso em mais de 92% das explantes. Quando o enraizamento se deu *ex vitro*, apesar de mostrarem uma percentagem média de 85% de enraizamento, as raízes se mostraram frágeis e em baixa quantidade, bem como foi baixa a sobrevivência. Sendo assim evidencia-se a superioridade da indução ao enraizamento realizado *in vitro* na presença de AIB (12,5 μ M).
- 4) É possível o emprego de técnicas *in vitro* e *ex situ* para a conservação de germoplasma de *Dyckia distachya*; além de otimizar tempo e espaço, as culturas estão livres do ataque de patógenos e da pressão exercida sobre os ambientes nos quais ela se insere. Outra vantagem dos Bancos de Germoplasma *in vitro* é facilitar o intercâmbio de material vegetal entre instituições.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram o potencial de emprego das técnicas de cultura de tecidos vegetais para a propagação massal e a conservação de *Dyckia distachya* Hassler. Os impactos destes resultados podem ser resumidos sob dois primas fundamentais: o emprego de sementes como explantes poderá permitir a propagação massal e a consequente manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais. Por outro lado a utilização das técnicas de embriogênese somática, indiscutivelmente poderia otimizar a clonagem de genótipos superiores.

Neste sentido, é de grande valia o prosseguimento dos estudos no âmbito da reintrodução de espécies propagadas *in vitro* como forma de resgatar as populações naturais de *Dyckia distachya* em consequência das alterações no seu ambiente natural. Em complemento a isto, uma melhor compreensão dos processos morfogenéticos *in vitro*, poderia fornecer, em um futuro próximo, plantas clonadas de espécimes elite como requisitado para os fins comerciais ou mesmo para recuperar áreas impactadas.

No sentido da conservação de germoplasma se faz necessário a manutenção destas culturas em um ambiente asséptico e de fácil manipulação, visto a preocupação dos órgãos ambientalistas e pesquisadores em geral na manutenção da diversidade genética das populações originárias da Mata Atlântica.

O estudo realizado para esta espécie poderá servir de base para estudos mais aprofundados com esta e outras bromeliáceas da Floresta Atlântica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEODATO, S.. O mundo das bromélias. **Globo Ciência**, São Paulo, v.7, n.76, p.40-44, nov.1997.
- AITKEN-CRISTIE, J.. Automation. IN: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. [ed.]. **Micropropagation : Technology and application**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1991. p.363-388.
- ALMEIDA, D.R.; CARVALHO, L.C.; ROCHA, C.F.D.. Bromeliads of the Atlantic forest at Ilha Grande, RJ : species composition and diversity of three habitats. **Bromélia**, São Paulo, v.5, n.1-4, p.54-65, 1998.
- ALVES, G.M.; GUERRA, M.P.. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, Florianópolis, v.51, n.05, p.202-212, sep-oct., 2001.
- ALVES, G.M.. **Micropropagação e Conservação de *Vriesea reitii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa***. 2000. 97f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L.. Enraizamento de plantas lenhosas. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. [e.d.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa, 1999. v.1, p. 261-296.
- BACH, A.. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and meristems of *Freesia hybrida*. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v.325, p.429-434, 1992.
- BENSON, E.E.; LYNCH, P.T.; STACEY, G.N.. Advantages in plant cryopreservation technology : current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information**, [s.l.], v.10, n.5, p.133-141, 1998.
- BENZING, D.H.. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690p.
- BENZING, D.H.; STILES, K.E.. Seed dispersal by fleshy-fruited bromeliads : misconceptions and directions for deeper inquiry about mechanisms. **Bromélia**, São Paulo, v.5, n.1-4, p.23-35, 1998.
- BERNARDELLO, L.M.; GALETTO, L.; JULIANI, H.R.R.. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean *Bromeliaceae*. **Annals of Botany.**, London, v.67, p.401-411, 1991.
- BEWLEY, J.D.. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, Ontario, v.9, p.1055-1066, jul. 1997.
- BORKOWSKA, B.. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. **Scientia Horticulturae**, Skierniewice, v.89, p.195-206, 2001.
- CÂNDIDO, M.S.D.. Growing *Cryptanthus* plants. **Bromélia**, São Paulo, v.3, n.1, p.33-37, mar.1996.

- CARNEIRO, L.A. [et.al.]. 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**, Netherlands, n.55, p.79-83, 1999.
- CARNEIRO, L.A. [et.al.]. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rio de Janeiro, v.4, n.3-4, p.152-158, 1998.
- CASTILLO, P. [et al.]. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, Morelos, v.151, p.115-119, 2000.
- CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. **Plant Cell Reports**, Urbana, v.16, p.385-388, 1997.
- CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Efficient plant regenerationn through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Science**, Taiwan, n.160, p.87-93, 2000.
- CHIARELLO, A.G.. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. **Biological Conservation**, Cambridge, v.89, p.71-82, 1999.
- CHOFFE, K.L. [et.al.]. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L. : Direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Ontario, n.36, p.30-36, jan./feb.2000
- CINCOTTA, R.P. [et al.]. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, Washington, v.404, p.990-992, 27 apr., 2000.
- COELHO, G.V.A. [et al.]. Efeito do AIB e da sacarose no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.67.
- CONSERVATION OF HOTSPOTS. **Conservation**. Disponível na Internet. <http://www.conservation.org>. Acessado em 20 novembro 2001.
- COSTA, T.; ZAFARI, G.R.. Micropropagação de clones de abacaxizeiro cv. Pérola em Santa Catarina. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.256.
- CRUZ, G.S.; CANHOTO, J.M.; ABREU, M.A.. Somatic embryogenesis and Plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v.66, n.2, p.263-270, 1990.
- DAQUINTA, M.M.; ALMEIDA, A.; GUERRA, M.P.. In vitro morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of Bromeliad Society**, Florianópolis, v.49, n.2, p.72-76, 1999.
- DAL VESCO, L.L. [et.al.]. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, Florianópolis, v.56, n.3, p.143-154, 2001.
- DAL VESCO, L.L.; NOVAES, A.L.T.; PINTO, T.H.; POMPELLI, M.F.; RIBEIRO, R.J.; GUERRA, M.P.. Protocolo para a micropropagação de bromélias em biofábricas.

- In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, **Resumos**. Ilhéus, 2001. 294p. p. 278.
- DE JONG, A.J.; SCHMIDT, E.D.L.; VRIES, S.C.. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, n.22, p.367-377, 1993.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J.. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v.14, n.4, p.335-345, 1981.
- DEBIASI, C.. Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira in vitro cvs. **Grand Naine (AAA)**, **Nanicão (AAA)** e **enxertos (AAB)**. 2000. 97p.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Curso de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DINESHKUMAR, V. [et al.]. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Science**, New Delhi, v.109, p.207-213, 1995.
- DRUEGE, U. [et. al.]. Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of *Chrysanthemum* cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold-storage. **Annals of Botany**, Stuttgart, v.85, p.687-701, 2000.
- DUARTE, O.R.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS, B.G.F.. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Jaboticabal, v.21, n.1, p.60-64, 1992.
- DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology & Genetic Engeneering Review**. England, v.6, p.341-378, 1988.
- EAPEN, S.; GEORGE, L.. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.22, n.2, p.87-93, aug., 1990.
- FEUSER, S.. **Aplicação de técnicas biotecnológicas no melhoramento do abacaxizeiro (*Ananas comosus*)**. 2000. 76f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FIRN, R.D.. Growth substance sensitivity : The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiological Plant**, [s.l.], n.67, p.267-272, 1986.
- FISCHER, E.A.; ARAUJO, A.C.. Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic rainforest, south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Campinas, n.11, p.559-567, 1995.
- FISCHER, G.; ZIMMER, K.. Regeneration of germinating seeds in vitro. **Acta Horticulturae**, Hannover, n.226, p.615-618, 1988.
- FONSECA, G.A.B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**. n. 34, p. 17-34, 1985.
- FRANCO, E.T.H.; FERREIRA, A.G.. Germinação de embriões somáticos, crescimento e aclimatação de plântulas de *Didymopanax morototoni*. In.:

CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.294.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **SOS Mata Atlântica.** Disponível na Internet. <http://www.sosmatatlantica.org.br>. Acessado em 20 novembro 2001.

GALETTO, L.; BERNARDELLO, L.M.. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae : structure and nectar composition. **Canadian Journal of Botany.**, Córdoba, v.70, n.06, p.1101-1106, jun., 1992.

GEOCITIES. **A Bromélia na trama da Malária.** Disponível em: . http://www.br.geocities.com_bromelia98.caeg. Acesso em 15/06/2001.

GEORGE, E.F.. **Plant propagation by tissue culture.** Part 2. Exegetic : Edington. 1993.

GOMES, G.A.C. [et. al.]. Enraizamento *in vitro* de brotações de *Salix humboldtiana* Willd. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Resumos.** Ilhéus, 2001. 294p. p.264.

GUERRA, M.P. [et. al.]. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B.. Embriogênese somática e sementes sintéticas. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. [e.d.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília : Embrapa, 1999. v.2, p. 533-568.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W.. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae) : Control and structural features. **Journal of Plant Research.** n 111, p.65-71, 1998.

_____. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). IN: AHUJA, R. [e.d.]. **Woody Plant Biotechnology.** New York : Plenum Press, 1991, p.189-196.

_____. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, n.7, p.550- 552, 1988.

HABERMANN, G. [et. al.]. Enraizamento de estacas de laranja-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Valência) sadias e com CVC (clorose variegada dos citros), através do uso de fitoreguladores. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Resumos.** Ilhéus, 2001. 294p. p.65.

HABERLANDT, G.. Cultuversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss., Wien, v.111, n.1, p. 69-92, 1902.

HARDING, K. BENSON, E.E. CLACHER, K. Plant conservation biotechnology : An overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, [s.l.], may-june, 1997.

HARRY, I.S.; THORPE, T.A.. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. **Botanical Gazette**, v.152, n.4, p.446-452, 1991.

- HOSOKI, T.; ASAHIRA, T.. In vitro propagation in liquid culture. **HortScience**, Kyoto, v.15, n.5, p.603-604, oct. 1980.
- HERINGER, H.; MONTENEGRO, M.M. [org.]. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília : MMA/SBF, 2000. 40p.
- HU, C.Y.; VANG, P.J.. Meristem, shoot tip, and bud cultures. IN: EVANS, D.A., *et al.* [eds.]. **Handbook of plant cell culture**. New York : Macmilan, 1983. v.1, p.177-227.
- JAIN, A.; KANTIA, A.; KOTHARI, S.L.. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. **Scientia Horticulturae**, Jaipur, v.87, p.319-326, 2001.
- JARVIS, B.C.. Endogenous control of adventitious rootings in non woody cuttings. IN: JACKSON, M.B [ed.]. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, 1986, p.191-222.
- JOSTEN, P.; KUTSCHERA, U.. The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. **Annals of Botany**, Kassel, v.84, p.337-342, 1999.
- KEVERS, C. [*et al.*]. Composition of the walls of stem and leaves of vitrifying carnation. **Biological Plant**, v.30, p.219-233, 1988.
- KLEIN, R.M.. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção : Estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro : IBGE, 1990. v.1.
- KNUDSON, L.. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, [s.l.], n.15, p.214-217, 1946.
- KREMEN, C. [*et al.*] Economic incentives for rain forest conservation across scales. **Science**, Stanford, v.288, p.1828-1832, 9 jun., 2000.
- KRIKORIAN, A.D.. Medios de cultivo : generalidades, composición y preparación. IN: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. [ed.]. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura – Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991, p.41-77.
- KUKULCZANKA, K.; CZASTKA, B.. Propagation of some species of the Bromeliaceae family cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wroclaw, n.251, p.167-172, 1989.
- LEME, E.M.C.. A new species in the path of a hydroelectric. **Bromélia**, São Paulo, v.3, n.3, p.22-25, sep.1996.
- _____. Bromélias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.3, n.14, p.66-72, 1984.
- LIMA, N.N. [*et al.*]. Novo suporte para a cultura de tecidos vegetais *in vitro*. In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, **Resumos**. Ilhéus, 2001. 294p. p.283.
- LITTLE, E.L.; MAGBANUA, Z.V. PARROTT, W.A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, Athens, n.19, p.351-357, 2000.

- LITZ, R.E.; JARRET, R.L.. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. IN: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. [ed.]. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura – Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991, 970p.
- LÓPEZ-ARANDA, [et al.]. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and fruiting capacity of their progeny. **Journal of Horticultural Science**, Málaga, v.69, n.04, p.625-637, 1994.
- LUTHER, H.E.. Some thoughts on bromeliad horticulturae and conservation. **Bromélias**, São Paulo, v.1, n.2, p.3-6, jun.1994.
- LUO, J.P. [et.al.]. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. **Plant Science**, Hefei, n.143, p.93-99, 1999.
- MAHESWARAN, G.; WILIAMS, E.G.. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. **Annals of Botany**, London, v.56, p.619-630, 1985.
- MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R.. In vitro culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, Tempe, n.81, p.71-87, 1999.
- MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L.. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M.7, M.9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.11-19, abr. 2001.
- MEDINA, E.; TROUGHTON, J.H.. Dark CO₂ fixation and the carbon isotopo ratio in Bromeliaceae. **Plant Science Letters**, Amsterdam, n.2, p.357-362, 1974.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoot as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.10, n.03, p.225-228, 1998.
- _____. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.40, 1997.
- _____. The importance of tissue technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from Atlantic Rain Forest canopy. **Selbyana**, São Paulo, v.16, n.2, p.147-149, 1995.
- _____. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, São Paulo, v.1, n.6, p.70-72, 1993.
- _____. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n.30, p.247-249, 1992.
- MERCIER, H.; YOSHIDA, K.. Bromelin activity in the leaf tissue of *Bromelia antiacantha*. **Journal of the Bromeliad Society**, v.48, n.01, p.06-10, 1998.
- MERKLE, S.A.. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v.1, n.3, p.112-121, 1995.

- METTE, A.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R.. Regeneração *in vitro* de *Vriesea fosteriana* e *Vriesea platynema*. In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.270.
- MOREL, G.M.; WETMORE, R.H.. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**. [s.l.], n.38, p.141-143, 1951.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, [s.l.], n.15, p.473-497, 1962.
- MYERS, N. [*et al.*]. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Oxford, v.403, p.853-858, 24 feb., 2000.
- NADKARNI, N.M.. Roots that go out on a limb. **Natural History**, [s.l.], v.94, n.2, p.42-48, 1985.
- NATO, A. [*et al.*]. Expression of auxin and light-regulated arrestin-like proteins, G proteins and nucleoside diphosphate kinase during induction and development of wheat somatic embryos. **Plant Physiology Biochemical**, Paris, v.38, n.06, p.483-490, 2000.
- NOBRE, J.. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, p.151-155, 1996.
- OLTRAMARI, A.M. [*et al.*]. Protocolo de Micropropagação de Goiabeira Serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.61-68, 2000.
- PACLOBUTRAZOL – Herbicide Fact Sheet. [S.l.]. USDOE-Bonneville Power Administration – U.S. Department of Energy, Mar 2000. Folder Informativo.
- PARK, Y.S.; BARRETT, J.D.; BONGA, J.M.. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry : deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, [s.l.], v.34, p.231-239, Jul-Sept, 1998.
- PASQUAL, M.; LOPES, P.A.. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.26, n.7, p.975-980, 1991.
- POMPELLI, M.F.; PINTO, T.H.; GUERRA, M.P.. Micropropagação de *Dyckia distachya* : Uma Bromélia Ameaçada de Extinção. In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.271.
- PIERIK, R.L.M.; SPRENKELS, P.A.. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. **Journal of the Bromeliad Society**, Netherlands, v.41, n.01, p.09-12, jan./feb. 1991.
- PIMM, S.L. [*et al.*]. Can we defy nature's end? **Science**, New York, v.293, p. 2207-2208, 21 sep., 2001.
- QURESHI, J.A. [*et al.*]. Modulation of somatic embryogenesis in early and late-stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of (\pm)-abscisic acid and

- its analogs. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.18, n.1, p.35-49, jul., 1989.
- RAUH, W.. The bromeliad lexicon. **Blandford**, London, 1990.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L.L.; POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P.. Embriogênese somática em *Vriesea reitzii* Reitz. In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, VIII, 2001, Resumos. Ilhéus, 2001. 294p. p.278.
- REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária-Bromélia endêmica : Flora ilustrada Catarinense**. [s.l. : s.n.], 1983.
- ROUT, G.R. [et al.]. Biotechnology of the rose : a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**, Orissa, v.81, p.201-228, 1999.
- 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.
- SAGE, D.O.; LYNN, J.; HAMMATT, N.. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. **Plant Science**, Warwick, v.150, p.209-216, 2000.
- SANTOS, R.L.; ALMEIDA, M.G.. Presence of *Searma angustipes* Dana, 1852 (Crustacea, Grapsidae, Sesarminae) in *Hohembergia* sp. tanks at Ponta do Cotovelo (Parnamirim, RN). **Bromélia**, São Paulo, v.5, n.1-4, p.67-73, 1998.
- SARMA, K.S.; ROGERS, S.M.D.. Plant regeneration from seedlings explants of *Juncus effusus*. **Aquatic Botany**, Salem, v.68, p.239-247, 2000.
- SHARMA, K.K.; THORPE, T.A.. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. IN: THORPE, T.A. [ed.]. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher, 1995, p. 17-72.
- SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J.. Embriões somáticos e sementes sintéticas. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., [ed.]. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : Imprensa Nacional, 1990. 433p.
- STEFANELLO, S.. **Elucidação de pontos de controle da embriogênese somática em goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.)**. 2000. 92f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SKOOG, F.; MULLER, C.O.. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. IN: BELL, E. [ed.]. **Molecular and Cellular Aspects of Development**. New York : Harper and Row, 1965, p.481-494.
- STREHL, T.. Periodically submersed bromeliads. **Bromélia**, São Paulo, v.1. n.3, p.19-21, set, 1994.
- SUDHA, C.G.; SEENI, S.. *In vitro* propagation of *Rauwolfia micrantha*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.44, p.243-248, 1996.
- TAIZ, L., ZEIGER, E.. **Plant Physiology**. [s.l. : s.n.], 1998.

- TAMAKI, V.; MERCIER, H.. Variações diurnas na acidez vacuolar e na atividade da PEP-carboxilase em *Tillandsia pohliana* Mez (Bromeliaceae) cultivada *in vitro*. **Bromélia**, São Paulo, v.4, n.3, p.16-23, 1997.
- TEISSON, C.. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. **Acta Horticultural**, [s.l.], n.440, p.521-526, 1996.
- TENG, W.L., NICHOLSON, L., TENG, M.C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports**, Shatin, n.16, p.831-835, 1997.
- TIWARI, K.N. [et al.]. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.63, p.179-185, 2000.
- TOMBOLATO, A.F.C.. [et al.]. Cultura *in vitro* da Bromélia. In: O Agrônomo, Campinas : [s.i.], 1991.
- TONON, G.; CAPUANA, M.; DI MARCO, A.. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. **Scientia Horticulturae**, Firenze, v.87, p.291-301, 2001.
- TOONEN, M.A.J.; SCHMIDT, E.D.L.; VRIES, S.C. Cell tracking as a tool to study initial processes in somatic embryo development. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, [s.l.], v.2, n.1, p.3-10, 1996.
- TORNÉ, J.M. [et al.]. Embryogenesis induction in petals of *Araujia sericifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.51, p.95-102, 1997.
- TORNÉ, J.M.; CLAPAROLS, I.; SANTOS, M.A.. Somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.29, n.3, p.269-274, jun., 1992.
- TORNERO, O.P. [et al.]. Assessment of factors effecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Murcia, v.158, p.61-70, 2000.
- THORPE, T.A.. Organogenesis *in vitro* : Structural, physiological and biochemical aspects. IN: VASIL, I.K. [e.d.]. **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York : Academic Press, 1980, p.71-111.
- VAN DER LINDE, P.C.G. Hormone action and sensitivity: possible relation to aging. IN: RODRIGUES, R.; SANCHES, M.; TAMES, R.; DURZAN, D.J. [ed.]. **Plant Aging : Basic an Applied Approaches**. New York : Plenum Press, 1990, p.285-292.
- VINTERHALTER, B; VINTERHALTER, D. True-to-the-type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. **Scientia Horticulturae**, n.57, p.253-263, abr., 1994.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T.. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. IN: Torres, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. [e.d.]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : Embrapa, 1999, v.1. p.297-330.
- YASUDA, H. [et al.]. Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. **Plant Science**, Hokkaido, v.152, p.1-6, 2000.

- YEUNG, E.C.. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. IN: THORP, T.A., [e.d.]. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1995. p.205-247.
- YIN, Y.P. [*et al.*]. Effects of storage temperature and container type on the vigour of Welsh onion seeds with low moisture content. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, [s.l.], v.39, n.8, p.1025-1028, 1999.
- ZIV, M.. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. [ed.] **Micropropagation : Technology and Application**. London : Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45-69.
- ZORNIG, R.K.. Micropropagation of Bromeliads. **Bromélia**, São Paulo, v.3, n.3, p.03-08, set. 1996.

ANEXO
RESUMO DAS ANÁLISES
DE VARIÂNCIA E DE
REGRESSÃO

Tabela 1 – Resumo da Análise de Variância para brotos por grama e brotos por explante em *Dyckia distachya*, cultivadas *in vitro*, em resposta ao BAP e KIN, suplementados ao meio de cultura, após 120 dias de cultivo. Dados de peso fresco transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o n.º de brotos em $\log(x+2)$. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	Brotos por Grama		Brotos por Explante	
	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	14	0,314**	14	0,257**
Resíduo	42	0,035	42	0,046
Total	56		56	
CV (%)	16,76		25,74	

** p<0,01

Tabela 2 – Resumo da Análise de Regressão para Brotos por grama em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas *in vitro*, em resposta ao BAP e KIN, suplementado ao meio de cultura, após 120 dias de cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	Coeficiente		Nível de Significância	
	BAP	KIN	BAP	KIN
Constante	25,544	5,686	0,031*	0,031*
Linear	5,646	1,982	0,019*	0,003**
Quadrática	-0,135	-0,053	0,060 ^{ns}	0,008**

* p<0,05; ** p<0,01; ns = não significativo

Tabela 3 – Resumo da Análise de Regressão para Brotos por explante em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas *in vitro*, em resposta ao BAP e KIN, suplementado ao meio de cultura, após 120 dias de cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	Coeficiente		Nível de Significância	
	BAP	KIN	BAP	KIN
Linear	10,103	3,099	0,030*	0,022*
Quadrática	-1,641	-0,470	0,056 ^{ns}	0,052 ^{ns}
Cúbica	0,088	0,024	0,080 ^{ns}	0,079 ^{ns}
Quarta	-0,001	-0,0004	0,098 ^{ns}	0,099 ^{ns}

* p<0,05; ns = não significativo

Tabela 4 – Resumo das Análises de Variância para brotos por explante em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados ANA (0, 1 e 2µM), BAP (0, 1, 2 e 4µM) e PBZ (0, 3, 5 e 6µM), solidificados ou não com ágar (0,6%) ao longo dos subcultivos. Dados de peso fresco transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o n.º de brotos em $\log(x+2)$. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	45 Dias		75 Dias		112 Dias		142 Dias	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	12	0,328**	12	0,733**	12	0,889**	12	1,005**
Resíduo	26	0,015	26	0,008	26	0,023	26	0,035
Total	38		38		38		38	
CV (%)	14,49		7,56		10,61		12,32	

** p<0,01

Tabela 5 – Resumo da Análise de Variância para os valores médios nos subcultivos para brotos por explante em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), solidificados ou não com ágar (0,6%). Dados de peso fresco transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o n.º de brotos em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	12	0,927**
Subcultivos	03	1,215**
Residual	36	0,019
Total	51	
CV (%)		11,19

** p<0,01

Tabela 6 – Resumo das Análises de Variância para brotos por grama em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), solidificados ou não com ágar (0,6%) ao longo dos subcultivos. Dados de peso fresco transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o n.º de brotos em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	45 Dias		75 Dias		112 Dias		142 Dias	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	12	0,321**	12	0,359**	12	0,219**	12	0,183**
Resíduo	26	0,013	26	0,005	26	0,011	26	0,009
Total	38		38		38		38	
CV (%)		14,94	8,17	10,69	11,04			

** p<0,01

Tabela 7 – Resumo da Análise de Variância para os valores médios nos subcultivos para brotos por grama em explantes de *Dyckia distachya*, cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados ANA (0, 1 e 2 μ M), BAP (0, 1, 2 e 4 μ M) e PBZ (0, 3, 5 e 6 μ M), solidificados ou não com ágar (0,6%). Dados de peso fresco transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e o n.º de brotos em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	12	0,297**
Subcultivos	03	0,096**
Residual	36	0,021
Total	51	
CV (%)		16,72

** p<0,01

Tabela 8 – Resumo da Análise de Variância para percentagem média de indução embriogenética de bases foliares de *Dyckia distachya*, em resposta a diferentes concentrações de 2,4-D e KIN (1,0 μ M), 60 dias após a inoculação. Dados transformados em log (x+1). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	4	0,882**
Resíduo	10	0,045
Total	14	
CV (%)		21,93

** p<0,01

Tabela 9 – Resumo da Análise de Variância para percentagem média de indução de culturas embriogênicas de *Dyckia distachya*, em resposta ao 2,4-D e Picloram (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 μ M), 60 dias após a inoculação. Dados transformados em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	4	2,148**
Resíduo	10	0,062
Total	14	
CV (%)		14,95

** p<0,01

Tabela 10 – Resumo da Análise de Variância para percentagem média de indução embriogênica e número de embriões formados em *Dyckia distachya*, cultivadas *in vitro*, em resposta ao 2,4-D e Picloram (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 μ M), 120 dias após a inoculação. Dados transformados em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	% de Indução		N.º de Embriões formados	
	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	7	0,441**	7	0,455 ^{ns}
Resíduo	16	0,073	16	0,202
Total	23		23	
CV (%)		19,13	31,11	

** p<0,01; ns = não significativo

Tabela 11 – Resumo da Análise de Variância para a não resposta, % de indução e n.º de embriões formados em EZ de *Dyckia distachya*, cultivados *in vitro*, sob diferentes concentrações de auxinas e citocininas, 10 semanas após a inoculação. Dados transformados em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	Não resposta		% de indução		N.º de Embriões	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
A x B	06	0,108*	6	0,840**	6	1,344**
Resíduo	14	0,028	14	0,003	14	0,014
Total	20		20		20	
CV (%)		11,62	3,79		6,82	

* p<0,05; ** p<0,01

Tabela 12 – Resumo da Análise de Variância para as interações auxina e citocinina, para a não resposta, % de indução e n.º de embriões formados em EZ de *Dyckia distachya*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de auxinas e citocininas, 10 semanas após a inoculação. Dados transformados em log (x+2). LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	Não resposta		% de indução		N.º de Embriões	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Auxina	1	0,003 ^{ns}	1	0,229**	1	0,925**
Citocinina	2	0,113 ^{ns}	2	0,012 ^{ns}	2	0,042 ^{ns}
AB	2	0,091 ^{ns}	2	0,015*	2	0,018 ^{ns}
Resíduo	12	0,030	12	0,004	12	0,016
Total	17		17		17	
CV (%)		12,43	3,61		6,47	

* p<0,05; ** p<0,01; ns = não significativo

Tabela 13 – Resumo da Análise de Variância para a percentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes de *Dyckia distachya*, em função do tempo de exposição ao AIB (12,5µM), após 30 dias de expressão em MS/0. Dados do número e tamanho das raízes foram transformados em $\sqrt{x+1}$. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	% de Enraizamento		N.º de Raízes		Comprimento das Raízes	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	4	0,177**	4	0,609*	4	1,068*
Resíduo	40	0,046	10	0,163	10	0,234
Total	44		14		14	
CV (%)	24,38		18,62		13,38	

* p<0,05; ** p<0,01

Tabela 14 – Resumo da Análise de Regressão para a percentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes de *Dyckia distachya*, em função do tempo de exposição ao AIB (12,5µM), após 30 dias de expressão em MS/0. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de Variação	% de Enraizamento		N.º de Raízes		Comprimento das Raízes	
	Coefficiente	Niv. Signif.	Coefficiente	Niv. Signif.	Coefficiente	Niv. Signif.
Constante	65,848	0,008**	1,049	0,074 ^{ns}	7,091	0,0007**
Linear	5,069	0,065 ^{ns}	0,545	0,017*	0,544	0,0008**
Quadrática	-0,190	0,100 ^{ns}	-0,017	0,039*		

* p<0,05; **p<0,01; ns = não significativo

Tabela 15 – Resumo da Análise de Variância para a percentagem média de germinação de sementes de *Dyckia distachya* sob diferentes formulações salinas e pHs., após 30 dias de cultivo. LFDGV-CCA/UFSC/2002.

Causas de variação	GL	QM
Tratamentos	4	455,833**
Resíduo	10	14,167
Total	14	
CV (%)		8,01

** p<0,01