

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS



ARLINDO RECH FILHO

**Biorreatores de imersão temporária e unidades
encapsuláveis como ferramentas na consolidação de
protocolos de micropropagação de bromélias**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Santa Catarina, como
parte dos requisitos necessários para a obtenção do
título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais
no Centro de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. MIGUEL PEDRO GUERRA.

FLORIANÓPOLIS-SC, AGOSTO DE 2004.

“O Senhor é meu Pastor, nada me faltará...” (Salmo 23).
“Direi do Senhor: Ele é meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei. Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciososa... Não terás medo do terror da noite nem da seta que voa de dia, nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio dia. Mil cairão ao teu lado, e dez mil a tua direita, mas não chegará a ti. Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos ímpios. Porque tu, ó Senhor, és o meu refugio!... (Salmo 91).

Ao meu eterno AMOR,
minha adorável esposa
JUCILENE CONSONI RECH

AGRADECIMENTOS

A Deus pai pelo dom da vida, pela saúde e força de vontade em alcançar meus objetivos.

Ao Prof. Guerra, principal responsável pela concretização deste trabalho, ORIENTADOR na maneira mais expressiva que se pode imaginar, meu MUITO OBRIGADO por sua orientação e incentivo, obrigado pela confiança e amizade construída nestes anos magníficos de academia e mestrado.

A minha esposa e eterna companheira Jucilene, MUITO OBRIGADO pelo incentivo, amor, carinho, e tantas outras coisas que me deram paz de espírito para poder concretizar este trabalho, obrigado por me entender quando eu estava super concentrado na dissertação e por vezes até nem escutava o que você falava, VALEU JUCI!!!

A minha família, e que família hein!!!, meu pai Arlindo, minha mãe Líria e meus irmãos Tiago, Isabela e Gustavo, obrigado pelo incentivo e pelo voto de confiança que depositaram em mim. Uma das coisas que mais me orgulho no mundo é fazer parte desta maravilhosa família.

A Neusa, obrigado pela amizade, pela ajuda nos trabalhos de laboratório e pelo grande apóio científico.

Aos guris Carlos e Richard, obrigado pelo apóio nos trabalhos de laboratório e pela grande amizade que construímos neste período.

Aos amigos Gilcimar, Gean, Fabiano, Paulão, Ney, Alexandre, Alain, Crevelatti, pelo velho churrasquinho de sexta feira, e pela honra de suas amizades.

Ao amigo Ângelo, muito obrigado pela força estatística e pelo grande laço de amizade.

Aos outros amigos do Núcleo de Pesquisa em Florestas Tropicais (NPFT), Mantovani, Siminski, Zagos, valeu pelos momentos de descontração, aquele velho chimarrão de sempre, e pela acolhida sempre muito calorosa, apesar de nunca ter ajudado vocês em nada me sinto parte do grupo, obrigado.

Ao amigo Lírio, obrigado pelo incentivo e pelo apóio estatístico-científico nos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV): Grasi, Cíntia, Luisa, Glaise, Gabriela, Vanildo, Felipe, Elaine Stolf, Douglas, Adriana, Karine, Kadine e Cia. Ltda., muito obrigado pela amizade, apóio e momentos de descontração.

Aos Profs. Aparecido, Nodari, Maurício, obrigado pela amizade e acessibilidade durante o curso.

Ao Prof. Marcelo Maraschin, obrigado pela atenção no aperfeiçoamento do trabalho através da inclusão das análises de compostos fenólicos.

Aos secretários Berna e Nilton, obrigado pela prestatividade.

A Dra. Monique Segeren (ProClone) pelo apoio financeiro via bolsa FAPESP, e também pela oportunidade do aperfeiçoamento na área de cultura de tecidos.

Ao Curso de PGRGV pelo apoio financeiro via bolsa CAPES, e oportunidade da consolidação desta caminhada.

A todos aqueles que não estão aqui listados e que torceram por mim ou me auxiliaram de alguma forma, meu muito obrigado.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho refere-se à dissertação de mestrado de Arlindo Rech Filho, aluno do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais do CCA/UFSC, sob a orientação do Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra.

O trabalho foi realizado no período de abril de 2002 a julho de 2004, no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV/FIT/CCA/UFSC). Esse Laboratório desenvolve trabalhos nas áreas de micropropagação e conservação genética de bromélias desde 1991.

As bromélias são componentes de grande importância na diversidade biológica da Floresta Atlântica, além disso, possuem importância ornamental e medicinal. Nos últimos tempos, a ação antrópica levou a devastação de parte significativa deste bioma ameaçando de extinção varias espécies, entre elas as bromélias, componentes essenciais na manutenção da diversidade, já que muitos organismos estão a elas associados.

RESUMO

A Floresta Atlântica, um dos biomas de maior biodiversidade do planeta, vem sofrendo nos últimos tempos uma erosão genética de seus componentes, entre eles as bromélias. Este grupo taxonômico é particularmente abundante nos ecossistemas associados a este bioma no Estado de Santa Catarina. Técnicas de cultura de tecidos vegetais compreendem um conjunto de ferramentas que podem ser empregadas com sucesso para a propagação massal e a conservação destas espécies. O presente trabalho objetivou consolidar protocolos de micropropagação para *A. fasciata*, *V. brusquensis*, *V. fosteriana*, *V. gigantea*, determinando as rotas morfogenéticas associadas às altas taxas de proliferação de brotos e comparando a eficiência dos sistemas de biorreatores de imersão temporária e o sistema de cultura estacionária. Avaliou-se a viabilidade da tecnologia de encapsulamento de microbrotos em hidrogel e estudaram-se os efeitos dos fitorreguladores ANA, BAP e PBZ, suplementados ao meio de cultura MS, na proliferação e aclimatização de brotos, bem como a composição fenólica do meio de cultura. Por fim avaliaram-se os efeitos do ANA, BAP e PBZ na obtenção de microbrotos e unidades encapsuláveis, bem como a influência do ANA, BAP, PBZ e AG₃, e do carvão ativo, na sobrevivência *ex vitro* das unidades encapsuláveis. Para *A. fasciata* o protocolo regenerativo *in vitro* teve como estágios: a) germinação *in vitro* de sementes em meio de cultura MS isento de fitorreguladores; b) sub-cultivos em meio MS suplementado com ANA (2µM) e BAP (4µM) e em meio MS isento de fitorreguladores; c) multiplicação massal em biorreatores de imersão temporária contendo meio de cultura MS suplementado com PBZ (2µM) e; d) aclimatização em substrato composto por casca de arroz carbonizada e suplemento mineral turfa fértil®. Este sistema revelou um potencial regenerativo de 895 plantas aclimatizadas por explante inicial, num período de 550 dias. Nesta mesma rota de micropropagação obteve-se um protocolo para *V. brusquensis*, onde o potencial regenerativo foi de 170 plantas por explante aos 555 dias. Os biorreatores de imersão temporária e a suplementação do meio de cultura com PBZ aumentaram significativamente a proliferação e facilitaram o processo de aclimatização das culturas. A melhor taxa proliferativa em *A. fasciata* foi associada a menor concentração de compostos fenólicos no meio de cultura. O PBZ (4 µM) promoveu taxas de multiplicação de 14 e 20 brotos/explante para *V. fosteriana* e *V.gigantea*, respectivamente. O emprego deste fitorregulador resultou em elevadas taxas de sobrevivência *ex vitro* das unidades encapsuláveis, com valores de 86% para *V.fosteriana* e 85% para *V. gigantea*. O AG₃ beneficiou o processo de estabelecimento *ex vitro*. Além disso, o PBZ, ANA e BAP, foram efetivos no incremento do número de folhas nas plântulas estabelecidas *ex vitro* via unidades encapsuláveis.

Palavras chave: aclimatização, bromélias, biorreatores de imersão temporária, paclobutrazol, unidades encapsuláveis.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is a biome holding high biodiversity. The devastation of this biome causes the genetic erosion of its components among them the bromeliads. This taxonomic group is particularly abundant in the ecosystems associated to this biome in the State of Santa Catarina, South Brazil. Tissue culture techniques are effective tools to be employed for the mass propagation and conservation of endangered bromeliads. The present work aimed at the establishment of protocols for the micropropagation of *A. fasciata*, *V. brusquensis*, *V. fosteriana*, *V. gigantea*, determining the morphogenetic routes associated to high regenerative rates and comparing the efficiency of the systems based on bioreactors of temporary immersion and stationary liquid culture. The technology of encapsulated units using microshoots in hydrogel was evaluated. The effects of NAA, BAP and PBZ in the regeneration and acclimatization as well as in the phenolic composition of the culture medium were also studied. Finally it was evaluated the effects of NAA, BAP and PBZ in the production of microshoots and encapsulated units as well as the influence of NAA, BAP, PBZ, GA₃, and activated charcoal in the *ex vitro* survival of encapsulated units. For *A. fasciata* the regenerative protocol had the following stages: a) *in vitro* germination of seeds inoculated on MS culture medium free of plant growth regulators; b) subculture to MS culture medium supplemented with NAA (2µM) and BAP (4µM), and in MS culture medium free of plant growth regulators; c) massal multiplication in temporary immersion bioreactors containing liquid MS culture medium supplemented with PBZ (2µM), and; d) acclimatization in substrate composed of carbonized rice coat and turfa fértil® mineral supplement (1:1 v/v). This system revealed a regenerative rate of 895 acclimatized plants per explant after 550 days. In *V. brusquensis* the regenerative rate was 170 plants after 555 days. The temporary immersion bioreactors and the supplementation of culture medium with PBZ enhanced the regenerative rate and facilitated the acclimatization of the plantlets. The best regenerative rate in *A. fasciata* was associated with the lowest concentration of phenolic compounds in the culture medium. For *V. fosteriana* and *V. gigantea* PBZ (4 µM) promoted regenerative rates of 14 and 20 shoots/explant. This substance enhanced rates of *ex vitro* survival of plantlet derived of encapsulated units, with values of 86% in *V. fosteriana* and 85% in *V. gigantea*. GA₃ also enhanced the *ex vitro* plantlet establishment. PBZ, ANA and BAP were effective in incrementing the leaf number of plantlets established *ex vitro* derived from encapsulated units.

Key words: acclimatization, bromeliads, bioreactors of temporary immersion, encapsulated units, paclobutrazol.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
OBJETIVO GERAL	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 1 - MICROPROPAGAÇÃO DE BROMÉLIAS EM BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material Vegetal	17
3.1.1. Introdução <i>in vitro</i>	17
3.1.2. Multiplicação das culturas	17
3.2. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação <i>in vitro</i> de <i>A. fasciata</i>	18
3.3. Efeito do volume e renovação do meio de cultura na proliferação <i>in vitro</i> de <i>A. fasciata</i>	19
3.4. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação <i>in vitro</i> de <i>V. brusquensis</i>	20
3.5. Aclimatização das culturas	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Material Vegetal	22
4.1.1. Introdução <i>in vitro</i>	22
4.1.2. Multiplicação das culturas	22
4.2. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação <i>in vitro</i> de <i>A. fasciata</i>	23
4.3. Efeito do volume e renovação do meio de cultura na proliferação <i>in vitro</i> de <i>A.fasciata</i>	28
4.4. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação <i>in vitro</i> de <i>V.brusquensis</i>	32
4.5. Aclimatização das culturas	37
4.6. Os protocolos regenerativos	39
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 2 - UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE BROMÉLIAS A PARTIR DE MICROBROTOS	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1. Material Vegetal	52
3.1.1. Introdução <i>in vitro</i>	52
3.1.2. Multiplicação das culturas.....	52
3.2. Consolidação de um protocolo regenerativo para <i>V. fosteriana</i>	53
3.2.1. Micropropagação massal	53
3.2.2. Estabelecimento <i>ex vitro</i> através de unidades encapsuláveis	53
3.3. Consolidação de um protocolo regenerativo para <i>V. gigantea</i>	55
3.3.1. Micropropagação massal	55
3.3.2. Estabelecimento <i>ex vitro</i> através de unidades encapsuláveis	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Material Vegetal	56
4.1.1. Introdução <i>in vitro</i>	56
4.1.2. Multiplicação das culturas.....	57
4.2. Consolidação de um protocolo regenerativo para <i>V. fosteriana</i>	57
4.2.1. Multiplicação das culturas.....	57
4.2.2. Estabelecimento <i>ex vitro</i> através de unidades encapsuláveis	59
4.3. Consolidação de um protocolo regenerativo para <i>V. gigantea</i>	63
4.3.1. Multiplicação das culturas.....	63
4.3.2. Estabelecimento <i>ex vitro</i> através de unidades encapsuláveis	65
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeito do PBZ e do sistema de cultivo na taxa proliferativa <i>in vitro</i> e na concentração de fenóis totais em <i>A.fasciata</i> aos 80 dias de cultivo.	24
Tabela 2. Efeito do PBZ na frequência dos brotos de <i>A.fasciata</i> nas diferentes classes de altura aos 80 dias de cultivo nos sistemas de imersão temporária (IT) e estacionária (IE).	24
Tabela 3. Efeito residual do PBZ e do sistema de cultivo no sub-cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. fasciata</i> em meio de cultura MS basal durante 90 dias. Os dados indicam a proliferação em brotos/explante.	25
Tabela 4. Efeito residual do PBZ e sistemas de cultivo em imersão temporária (IT) e estacionária (IE) na frequência de brotos de <i>A.fasciata</i> nas diferentes classes de altura, aos 90 dias de cultivo em meio de cultura MS isento de fitorreguladores. Os dados indicam a proliferação em brotos/explante e sua respectiva porcentagem.	27
Tabela 5. Efeito do PBZ, renovação de meio de cultura e volume de meio/explante na taxa proliferativa (PL) (brotos/explante) e fenóis totais (FT) (ng/uL) no cultivo <i>in vitro</i> de <i>A.fasciata</i>	28
Tabela 6. Efeito do PBZ, sub-cultivo e volume de meio/explante na porcentagem de frequência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm na micropropagação <i>in vitro</i> de <i>A. fasciata</i> nos sistema de cultivo em imersão temporária e estacionária. Os dados expressam porcentagem.	32
Tabela 7. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação <i>in vitro</i> de <i>V. brusquensis</i> aos 95 dias de cultivo nos sistemas de cultivo em imersão temporária e estacionária.	33
Tabela 8. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na frequência (%) e proliferação (PL) dos brotos de <i>V. brusquensis</i> nas diferentes classes de altura, aos 95 dias de cultivo nos sistemas de imersão temporária (IT) e estacionária (IE).	35
Tabela 9. Efeito residual do PBZ e BIT na proliferação total e nas diferentes classes de altura no sub-cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. brusquensis</i> em meio de cultura MS isento de fitorreguladores.	36
Tabela 10. Efeito do PBZ sobre o incremento de folhas e a sobrevivência de brotos de <i>V. brusquensis</i> e <i>A. fasciata</i> gerados em BIT.	37

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Efeito do PBZ na proliferação e frequência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm, no cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. fosteriana</i>	58
Tabela 2. Efeito do PBZ, AG ₃ e alginato de sódio na porcentagem de sobrevivência das unidades encapsuláveis aos 45 dias em fitotron.	59
Tabela 3. Efeito do AG ₃ no incremento médio de folhas de plântulas de <i>V. fosteriana</i> estabelecidas <i>ex vitro</i> através de unidades encapsuláveis. Culturas aos 60 dias em casa de vegetação.	60
Tabela 4. Efeito do ANA, BAP e PBZ na proliferação (brotos/explante) <i>in vitro</i> de <i>V.gigantea</i> aos 100 dias de cultivo em meio de cultura MS.	63
Tabela 5. Efeito do ANA, BAP e PBZ na frequência de brotos (%) na classe de 0 a 1,50 cm, no cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. gigantea</i> , em meio de cultura MS.	65
Tabela 6. Efeito do ANA, BAP, PBZ e do carvão ativo, na taxa de sobrevivência (%) das unidades encapsuláveis de <i>V. gigantea</i>	65
Tabela 7. Efeito do ANA, BAP e PBZ, e do carvão ativo no incremento médio de folhas no processo de estabelecimento <i>ex vitro</i> de unidades encapsuláveis de <i>V.gigantea</i>	66

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Distribuição geográfica das bromélias no mundo.....	3
Figura 2. Dispersão geográfica dos gêneros de bromélia em Santa Catarina	4
Figura 3. Espécies estudadas no presente trabalho.....	5

CAPÍTULO 1

Figura 1. Biorreator de imersão temporária	14
Figura 2. Efeito do PBZ na sobrevivência de brotos de <i>A.fasciata</i> gerados em BIT, aos 90 dias de sub-cultivo convencional em meio de cultura MS isento de fitorreguladores.	26
Figura 3. Efeito do tempo de sub-cultivo na excreção de fenóis (ng/uL) para o meio de cultura na micropropagação de <i>A. fasciata</i> em BIT, contendo 16 mL de meio de cultura/explante.	31
Figura 4. Efeito do PBZ na proliferação <i>in vitro</i> de <i>V. brusquensis</i>	33
Figura 5. Protocolo de micropropagação massal para <i>A. fasciata</i>	40
Figura 6. Protocolo de micropropagação massal para <i>V. brusquensis</i>	40
Figura 7. Micropropagação de <i>A. fasciata</i>	41
Figura 8. Micropropagação de <i>V. brusquensis</i>	42

CAPÍTULO 2

Figura 1. Efeito do PBZ na proliferação de brotos <i>in vitro</i> de <i>V. fosteriana</i> aos 120 dias de cultivo no sistema convencional em meio de cultura MS.	59
Figura 2. Protocolo regenerativo para <i>V. fosteriana</i> . Rota de estabelecimento <i>in vitro</i> , multiplicação e estabelecimento <i>ex vitro</i> via unidades encapsuláveis.	61
Figura 3. Unidades encapsuláveis de <i>V. fosteriana</i>	62
Figura 4. Efeito do PBZ na proliferação <i>in vitro</i> de <i>V.gigantea</i>	64
Figura 5. Protocolo regenerativo para <i>V. gigantea</i> Rota de estabelecimento <i>in vitro</i> , multiplicação e estabelecimento <i>ex vitro</i> via unidades encapsuláveis.	67
Figura 6. Unidades encapsuláveis de <i>V.gigantea</i>	68

ABREVIATURAS

AG₃: Ácido giberélico

AIA: Ácido indol-acético

ANA: Ácido naftaleno-acético

BAP: Benzilaminopurina

BIT: Biorreatores de imersão temporária

KIN: Cinética

MS: Murashige & Skoog (1962)

PBZ: Paclobutrazol

SNK: Teste de separação de médias Student Newman Keuls

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As bromélias são importantes componentes da Floresta Tropical Atlântica, encontrando-se associadas as mais variadas formas de vida. Suas cisternas desempenham a função de charcos e lagos pênseis, com microflora e microfauna especiais. Esses ambientes proporcionados pelas bromélias são de grande importância no que tange às interações ecológicas. É possível observar inúmeras espécies ocorrentes nas rosetas das bromélias, além da germinação de sementes de diversas plantas, que encontram nelas o ambiente ideal para iniciar seu desenvolvimento (REITZ, 1983).

Nos últimos 40 anos, as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* se constituíram num importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal, auxiliando na compreensão dos processos da biologia do desenvolvimento e para a utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais (WITHERS & WILLIAMS, 1998). A aplicabilidade das técnicas de cultura de tecidos associadas à micropropagação relaciona-se principalmente com a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável, preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção.

Uma das principais vantagens da micropropagação é a maior rapidez regenerativa em relação a outros métodos de propagação vegetativa convencionalmente utilizados, facilitando a propagação onde as tecnologias convencionais são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem realizadas (GEORGE, 1993).

Nas bromélias, a propagação clonal por divisão natural de brotações laterais é de baixa frequência, originando poucos filhos/planta/ano; já a propagação por meio da cultura de tecidos apresenta muitas vantagens, proporcionando o desenvolvimento de protocolos para a conservação do germoplasma e para a micropropagação massal que podem ser utilizados em escala comercial, diminuindo a pressão de extração destas espécies do seu habitat natural.

A micropropagação possibilita uma rápida proliferação, proporcionando a produção de propágulos em grande escala na fase de multiplicação (ZIV, 2000). Nesta técnica de propagação de plantas, a mecanização e automação tornam-se ferramentas-chaves dos processos de produção.

Os biorreatores de imersão temporária são considerados promotores da micropropagação (ZIV, 2000; LORENZO *et al.*, 2001; TEISSON & ALVARD, 1995) e, além deles; as unidades encapsuláveis (SAKAMOTO *et al.*, 1995) constituem ferramentas importantes na consolidação de protocolos de micropropagação massal de bromélias.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Floresta Tropical Atlântica é considerada um bioma de alta diversidade genética, onde existem locais restritos de endemismo e megadiversidade (REITZ, 1983). Ao longo dos anos, este bioma, um dos maiores centros de biodiversidade do planeta, vem sofrendo um acelerado processo de devastação, que trouxe como consequência a erosão genética de seus componentes (MYERS *et al.*, 2000). Essa devastação ameaça a maior parte das bromélias, importantes componentes deste bioma, submetendo algumas até mesmo ao risco de extinção, como é o caso da espécie *Vriesea brusquensis* (KLEIN, 1990), um dos objetos de estudo do presente trabalho.

A Floresta Atlântica ocupa o quarto lugar em diversidade de plantas do planeta, com vinte mil espécies, das quais seis mil são endêmicas, o que corresponde a 3% das espécies endêmicas do mundo, apesar da destruição de 92,5% de seu 1,2 milhão de quilômetros quadrados originais (HEYWOOD, 1995).

As bromélias são nativas do continente americano, com exceção da espécie *Pitcarnia feliciana* que ocorre na África (REITZ, 1983) (Figura 1). A família Bromeliaceae compreende 56 gêneros e cerca de 3,5 mil espécies. São ervas perenes que combinam uma grande variação de formas, cores e tamanhos. São encontradas praticamente em todos os ambientes, desde o nível do mar aos elevados altiplanos da cordilheira dos Andes, em locais úmidos como a Floresta Atlântica ou regiões áridas como a Caatinga. Podem ser terrestres, terrestres ocasionais, rupícolas, saxícolas ou epífitas, mas nunca parasitas (NUNES, 2002).

A maior diversidade encontra-se na América do Sul, estimando-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil. A costa leste do Brasil e o escudo das Guianas são considerados os dois centros de diversidade da família Bromeliaceae. A Floresta Atlântica é considerada um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, e vários de seus gêneros e espécies ocorrem exclusivamente nesse ecossistema, ou seja, são endêmicos. Além disso, muitas vezes podem estar limitados a áreas extremamente reduzidas (NUNES, 2002). O endemismo é uma característica marcante das bromeliáceas. Embora existam espécies espalhadas por extensas áreas, outras, entretanto, possuem suas populações confinadas em áreas restritas ou isoladas (LEME, 1984).

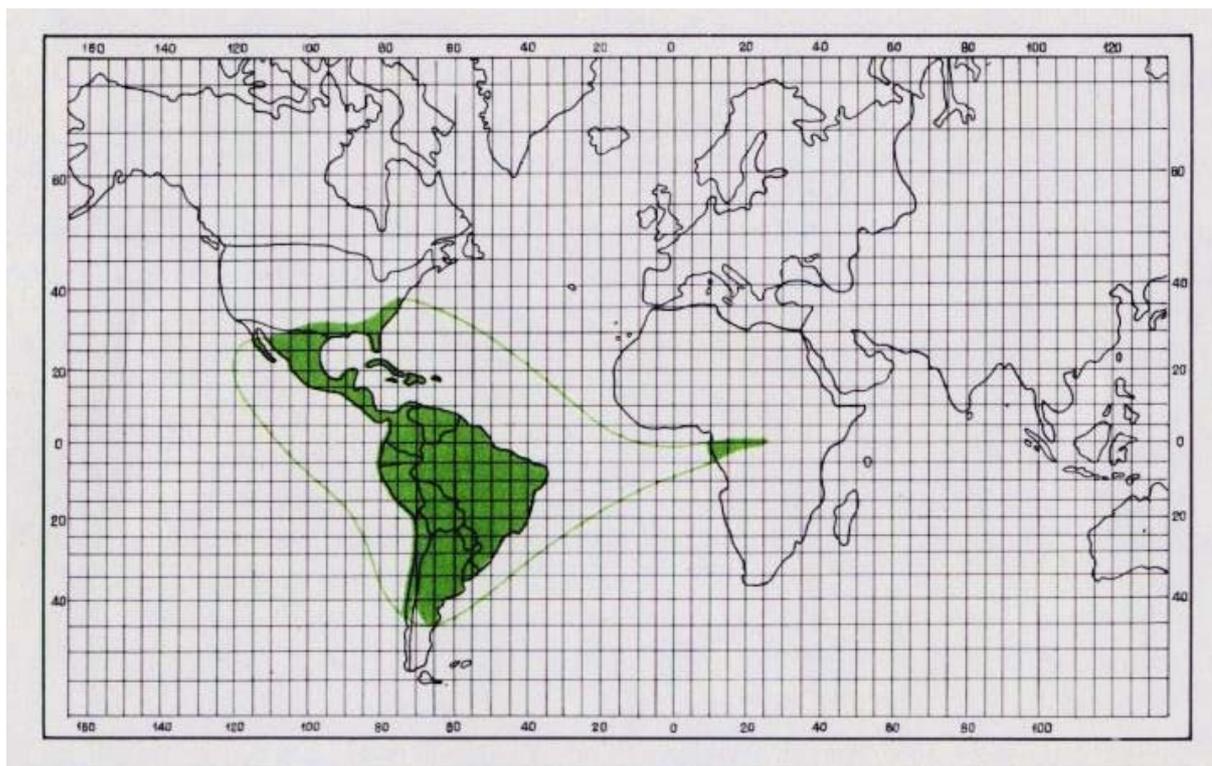


Figura 1. Distribuição geográfica das bromélias no mundo (Fonte: REITZ, 1983).

A distribuição das bromélias depende essencialmente de fatores climáticos. Ao longo do litoral do Estado de Santa Catarina, dominado pela floresta pluvial atlântica, a temperatura anual cai 2°C no sentido norte-sul, e a precipitação média é reduzida em 500 mm no mesmo sentido. Sendo influenciados pelo macroclima, os gêneros de caráter mais tropical vão desaparecendo do norte para o sul, à medida que a temperatura e o nível de precipitação declinam. Muitas bromélias encontram em Santa Catarina o limite sul para sua dispersão. Das 114 espécies e variedades que se encontram no norte do Estado, 94 chegam à serra de Tijucas, 62 vão até a serra do Tabuleiro e 41 chegam à divisa Sul de Santa Catarina (REITZ, 1983) (Figura 2).

As bromélias sofrem influência do microclima para distribuírem-se no interior da floresta, de acordo com a luminosidade e umidade relativa do ar. São identificados quatro níveis de fixação, do solo à copa das árvores. No primeiro nível, o solo, onde a luminosidade é pouca e a umidade relativa do ar é elevada, habitam as bromélias esciófilas, formando algumas vezes extensos tapetes. Estas são responsáveis, em parte, pela umidade do ambiente florestal, devido à evaporação da água que armazenam. No segundo nível, associado à região intermediária dos troncos das árvores do extrato dominante, bem como a arvoretas e arbustos, encontram-se as espécies médio-esciófilas. Neste nível, entre um e oito metros acima do solo, ainda há grande umidade e a luminosidade é reduzida. O terceiro nível abriga as bromélias

que demandam intensidade média de luz e mais umidade de que as espécies heliófilas, nas bases dos ramos que formam as copas das árvores, oito a vinte metros acima do solo. Neste nível encontra-se a maior variedade de bromélias, entre elas as de maior porte. O quarto nível abriga as espécies heliófilas, acima de vinte metros do solo, na copa das árvores, onde a luminosidade é intensa e a umidade relativa do ar é consideravelmente menor (REITZ, 1983).

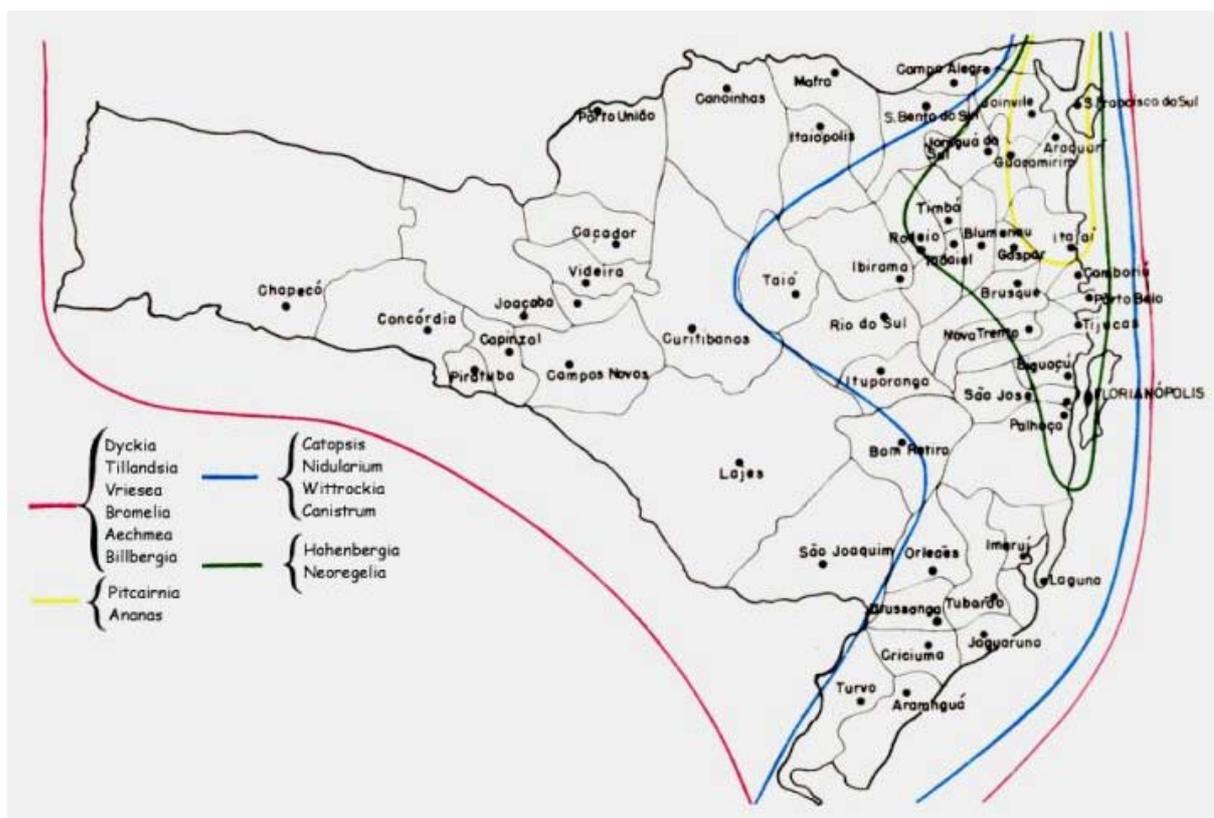


Figura 2. Dispersão geográfica dos gêneros de bromélias em Santa Catarina (Fonte: REITZ, 1983).

As bromélias têm as folhas com bainhas sempre livres, nunca formam um tubo fundido, embora muitas vezes as margens se sobreponham formando uma roseta. Sempre apresentam escamas peltadas (tricomas foliares) e as veias das folhas são longitudinais, as sépalas das flores contrastam com as pétalas e geralmente são acaules. Os estames são sempre em número de seis, o ovário é tripartido e as sementes têm em geral muito endosperma (SBB, 2003).

Bromélias são majoritariamente epífitas e as raízes servem principalmente como elemento de fixação, sendo, portanto, a constituição destas muito firme. Todas elas possuem caule, que na maioria dos casos é muito curto e retorcido. As folhas costumam apresentar uma parte alargada na base, chamada de bainha, cuja coloração é muito variada para as diferentes espécies. Nas bromélias catarinenses, nenhuma folha é peciolada e todas apresentam flores hermafroditas, nascendo estas na axila de uma bráctea (REITZ, 1983).

O gênero *Vriesea*, representado neste trabalho por *Vriesea platynema*, *Vriesea brusquensis* e *Vriesea gigantea*, compreende 257 espécies distribuídas nas três Américas desde o México e Cuba até o sul do Brasil e nordeste da Argentina (SMITH & DOWNS, 1979). Em Santa Catarina foram encontradas 31 espécies nativas do gênero *Vriesea*, ocorrendo em todo o estado e compondo o gênero mais numeroso, (REITZ, 1983).

Vriesea fosteriana (Figura 3) é uma bromélia que possui folhas irregularmente listradas transversalmente, adquirindo uma coloração marrom avermelhada, o que confere seu alto potencial ornamental. Suas inflorescências chegam até 1,5 m de altura, e suas flores abrem somente a noite atraindo polinizadores como morcegos e mariposas. Espécie epífita ocorrendo em locais com altitude inferior a 1000 m (BAENSCH & BAENSCH, 1994).



Figura 3. Espécies estudadas no presente trabalho. A. *Vriesea.brusquensis*. B. *Vriesea gigantea*. C. *Vriesea fosteriana*. D. *Aechmea fasciata*.

Vriesea brusquensis (Figura 3) é uma espécie rara de Santa Catarina (KLEIN, 1990), sendo que poucos exemplares ainda podem ser encontrados na restrita e inexpressiva área de dispersão nos municípios de Blumenau, Garuva, Luiz Alves e Brusque. É endêmica, epífita e

de grande interesse e potencial ornamental (REITZ, 1983), o que provavelmente contribuiu para que hoje esta espécie esteja em risco de extinção.

Vriesea gigantea (Figura 3), conhecida pelos nomes vulgares de gravatá e monjolão, é uma planta florífera, com 100 a 300 cm de altura, constituindo a maior das *Vrieseas* do Sul do Brasil. Suas folhas são muito numerosas, dispostas em roseta, formando uma enorme cisterna que pode reter até 4.000 cm³ de água. É característica e exclusiva da floresta pluvial da Encosta Atlântica, onde apresenta vasta e expressiva dispersão por toda a área desta floresta em Santa Catarina, nos municípios de Barra Velha, Blumenau, Brusque, Camboriú, Corupá, Florianópolis, Ibirama, Itajaí, Palhoça, Saleté e Sombrio (REITZ 1983).

Aechmea fasciata (Figura 3), outra espécie foco do trabalho, é exclusiva da Floresta Tropical Atlântica do Espírito Santo e Rio de Janeiro (REITZ, 1983). Possui um alto potencial ornamental, suas flores têm boa duração, tornando-a uma planta com boa estabilidade de mercado, ou seja, sua beleza faz com que esteja sempre entre as mais comercializadas.

Técnicas de cultura de tecidos incluem ferramentas que podem ser aplicadas para a propagação massal e a conservação de bromélias em extinção. Além disso, a micropropagação é uma técnica que já vem sendo empregada na propagação clonal de espécies de bromélias ornamentais que apresentam aumento na demanda e uma grande aceitação mundial.

O Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV/CCA/UFSC) vem desenvolvendo, nos últimos anos, trabalhos com micropropagação de bromélias, principalmente com espécies ameaçadas de extinção e de valor ornamental.

Assim, trabalhos feitos com *Nidularium innocentii*, resultaram em uma taxa média de proliferação de 23,0 brotos/explante, em meio de cultura MS suplementado com 2,0 µM de ANA e 4,0 µM de BAP. Para *Vriesea carinata* e *Wittrockia superba*, nesse tratamento a taxa média de multiplicação foi, 15,4 e 21,8 brotos/explante respectivamente (ALVES & GUERRA, 1995). Também ALVES & GUERRA (2001) obtiveram incremento regenerativo *in vitro* de microgemmas de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* na ordem de 44,96 vezes em meio de cultura MS suplementado com ANA (2 µM) e BAP (4 µM).

Com a espécie *Aechmea fasciata* foi obtida uma taxa média de multiplicação de 11,9 brotos/explante, em resposta ao meio de cultura MS suplementado com 2 µM de ANA e 4 µM de BAP (DAL VESCO *et al.*, 2001a).

Calos embriogênicos de *Vriesea reitzii* foram induzidos em meio de cultura MS isento de fitorreguladores e desenvolveram embriões somáticos em meio de cultura

suplementado com AG₃ (10 µM). Posteriormente o sub-cultivo em meio de cultura MS isento de fitoreguladores, promoveu a regeneração de plântulas que foram aclimatizadas com sucesso (RECH FILHO *et al.*, 2001).

A morfogênese *in vitro* de bromélias apresenta características específicas, as quais recebem terminologias diferentes. Desta forma, protuberâncias foram originadas na região basal de folhas de *Dyckia macedoi* submetidas a diferentes combinações de ANA e BAP, resultando no desenvolvimento de brotos adventícios (MERCIER & KERBAUY, 1993). Em conjunto os sais de MURASHIGE & SKOOG (MS, 1962), esses dois reguladores de crescimento de plantas vêm sendo utilizados com muita eficiência na indução de brotos adventícios de bromélias cultivadas *in vitro* (MERCIER & KERBAUY, 1997).

Em *Aechmea fasciata*, brotos adventícios foram diferenciados de calos induzidos de explantes foliares cultivados em meio de cultura MS suplementado com ANA e BAP (VINTERHALTER & VINTERHALTER, 1994).

Em *Dickia distachia*, uma bromélia em extinção do Sul do Brasil, a indução de calos foi observada quando peças da haste floral foram inoculadas em meios de cultura suplementados com diferentes tipos e níveis de auxinas (DAQUINTA *et al.*, 1998). Entretanto, estudos desenvolvidos por POMPELLI (2002), resultaram em um grande avanço na micropropagação desta espécie, a partir de explantes obtidos de semente. Esse autor observou que, quando foram suplementados ANA, BAP e PBZ ao meio basal MS líquido, ocorreram as mais altas taxas de multiplicação de brotos (133,6 brotos/explante), quando comparados com o uso de meio de cultura geleificado (72,9 brotos/explante).

Para o abacaxizeiro (*Ananas comosus*), cv. Pérola, o meio de cultura MS suplementado com ANA (2 µM) e BAP (4 µM), resultou em uma taxa de multiplicação média de 13,5 brotos/explante (DAL VESCO *et al.*, 2001b). Já GUERRA *et al.*, (1999) observaram taxas de proliferação de 19,7 brotos por explante em *Ananas comosus*, em meio de cultura MS líquido suplementado com ANA (2,7 µM) e BAP (4,4 µM).

Com *Cryptanthus sinuosos*, uma espécie de bromélia endêmica do leste brasileiro, folhas jovens foram empregadas como explantes que foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com BAP e TDZ. Alta taxa de proliferação de brotos foi obtida em meio de cultura com BAP (22 µM) e essas culturas mantiveram uma capacidade regenerativa durante dois anos (CARNEIRO *et al.*, 1998).

RECH FILHO *et al.* (2003b) observaram que, aos 100 dias de cultivo, a maior taxa média de proliferação (20,3 brotos/explante) de *Vriesea gigantea* ocorreu em resposta ao meio

de cultura MS suplementado apenas com PBZ (4 μ M), sem, contudo, revelar diferenças estatísticas das respostas obtidas com o meio de cultura suplementado com PBZ (6 μ M) e com ANA (2 μ M), BAP (4 μ M) e PBZ (4 μ M). Já aos 170 dias, observou-se que culturas provenientes da primeira fase em meio de cultura MS, suplementado com ANA (2 μ M), BAP (4 μ M) e PBZ (2, 4 ou 6 μ M) e sub-cultivadas para meio de cultura MS, isento de fitorreguladores, resultaram em uma taxa média de proliferação de 2,1 brotos/explante, configurando um efeito residual destes reguladores. Estes autores observaram que o PBZ pode induzir a formação de aglomerados de gemas, inibindo a dominância de microbrotos e aumentando a taxa proliferativa em sistemas de cultivo *in vitro*.

O PBZ, um fitorregulador derivado do triazol, cujos efeitos estão associados à inibição da biossíntese de giberelina, vem sendo utilizado com sucesso na propagação de plantas (LORENZO *et al.*, 1998). Sua ação foi comprovada por RESENDE & SOUZA (2002), que em seu trabalho com a cultura do alho constataram uma redução linear na altura das folhas, com o aumento dos níveis deste fitorregulador.

Em banana, geralmente o número de explantes por frasco de cultura é bastante limitado. O PBZ foi utilizado na micropropagação desta espécie e promoveu uma redução considerável no tamanho das plantas *in vitro*, criando novas perspectivas para o aumento do número de brotos por frasco de cultivo, e assim melhorando a eficiência dos sistemas de propagação massal desta espécie (DAQUINTA *et al.*, 2000).

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o emprego dos biorreatores de imersão temporária frente ao sistema convencional de cultivo em imersão estacionária, bem como o estabelecimento de plantas *ex vitro* através de unidades encapsuláveis, ambos como ferramentas potenciais na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.M.; GUERRA, M.P. Regeneração *in vitro* de espécies de bromélias da floresta atlântica. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Lavras-MG, **Anais...**, p.182, 1995.

ALVES, G.M.; GUERRA, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, v.51, n.5, p.202-212, 2001.

BAENSCH, U.; BAENSCH, U. **Blooming Bromeliads**. Tropic Beauty Publishers: Nassau/Bahamas, ISBN 0-9641056-0-8, 269P. 1994.

CARNEIRO, L.A.; CÂNDIDO, M.S.D.; ARAUJO, R.F.G.; FONSECA, M.H.P.B.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosos* L.B., an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v.4, p.153-158, 1998.

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 ornamentais em biofábricas. In: VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ilhéus, BA, **Anais...**, p.278, 2001a.

DAL VESCO, L.L.; PINTO, A.A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, v. 56, p.143-154, 2001b.

DAQUINTA, M.; ALMEIDA, A.P.; GUERRA, M.P. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 49, p.72-76, 1998.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; ESCALONA, M.; SANTOS, R. Multiplicación *in vitro* del banano FHIA-18 con paclobutrazol y thidiazuron en diferentes formas de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, n.1, p.86-88, 2000.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The Technology, ISBN 0-9509325-4-X, London: Exegetics Ltd., England, 574p. 1993.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Desenvolvimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1557-1563, 1999.

HEYWOOD, V.H. **Global Biodiversity Assessment**. UNEP/Cambridge University Press, 1140p, 1995.

KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção - Estado de Santa Catarina: mirtáceas e bromeliáceas**. IBGE, v.1, 283p, 1990.

LEME, E.M.C. Bromélias. **Ciência Hoje**, v.3, n.14, p.66-72. 1984.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.65, p.1-8, 2001.

LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.C.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.79-83, 1998.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, v.1, p.70-72, 1993.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In.: Bajai, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlim:Springer-Verlag. v.40, p.43-57, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMAYER, R.A.; MITTERMAYER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

NUNES, J.V.C. BROMÉLIAS. IN: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (eds). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**, São Paulo: SENAC, p.119-132, 2002.

POMPELLI, M.F. **Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler**, Florianópolis, SC, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, CCB/UFSC), 93p., 2002.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Embriogênese somática em *Vriesea reitzii* Leme & Costa. In.: VIII Congresso Brasileiro De Fisiologia Vegetal, Ilhéus, BA, **Anais...**, p.278, 2001.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; MÜLLER, C.V.; ALVES, G.M.; CUNHA, L.; GUERRA, M.P. Efeitos do Paclobutrazol na morfogênese *in vitro* de *Vriesea gigantea*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v15 (Suplemento, IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal), p.154, 2003b.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**, Flora ilustrada Catarinense série 983, Itajaí, SC, 559 p., 1983.

RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Efeito de doses de paclobutrazol na cultura do alho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.5, p.637-641, 2002.

SAKAMOTO, Y.; ONISHI, N.; HIROSAWA, T. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: Fennz, A.; Toyoki, C.; Schmit, M. A. **Automation and environmental control in plant tissue culture**, Kluwer Academics Publishers, Dordrecht Boston London, p.215-241, 1995.

SBB. **A família bromeliaceae**. Disponível em: <<http://www.bromelia.org.br/familia/familia.htm>> Acesso em 12 dezembro de 2003.

SMITH, L.B.; DOWNS, R. J. Bromeliaceae, subfamily Tillandsioideae. In: **Flora neotropica**, New York: Botanic Garden, 14, part 2, p.621-1492. 1979.

TEISSON, C.; ALVARD, D. A New concept of Plant *in vitro* Cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: Terzi, M.; Cella, R.; Falavigna, A. (eds). **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.105-110, 1995.

VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. **Scientia Horticulturae**, v.57, p.253-263, 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. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.1, p.297-330, 1998.

ZIV, M. Bioreactor Technology for plant micropropagation. **Horticultural Reviews**, v.24, p.1-30, 2000.

CAPÍTULO 1

MICROPROPAGAÇÃO DE

BROMÉLIAS EM

BIORREATORES DE

IMERSÃO TEMPORÁRIA

1. INTRODUÇÃO

Os biorreatores foram inicialmente utilizados para a micropropagação nos EUA, Japão, Taiwan, Coréia, Cuba, Costa Rica, Holanda, Espanha, Bélgica e França (ZIV, 2000). Eles vêm sendo utilizados para a micropropagação de bromélias ornamentais (Rech Filho *et al.*, 2003a), abacaxizeiro (FEUSER *et al.*, 2001; ESCALONA *et al.*, 1999), bananeira (ALVARD *et al.*, 1993; SANDÓVAL-YUGAR, 2002), citros (CABASSON *et al.*, 1997), batata (TEISSON & ALVARD, 1999), café (TEISSON & ALVARD, 1995), cana de açúcar (LORENZO *et al.*, 1998; 2001), seringueira (TEISSON & ALVARD, 1995), entre outras espécies.

A tecnologia proporcionada por este sistema de cultivo proporciona a produção de mudas em larga escala, com maior rapidez e eficiência em relação aos demais métodos convencionalmente utilizados. Além disso, essa tecnologia proporciona uma redução no custo dos propágulos produzidos, cujo valor está estimado em torno de US\$ 0,10 quando comparado ao sistema convencional (ZIV, 2000).

Os biorreatores de imersão temporária (BIT- Figura 1) vêm sendo utilizado com sucesso para a multiplicação rápida de brotos, consistindo de um novo conceito na utilização de meio líquido para a micropropagação. Este método, proposto inicialmente por ALVARD *et al.* (1993) utiliza frascos contendo as culturas em proliferação que recebem meio líquido em sistema de bombeamento temporário, ocorrendo um aumento substancial na taxa proliferativa.

Nos últimos anos, o sistema de cultivo em biorreatores de imersão temporária vem mostrando eficiência para multiplicação de várias espécies de plantas. Sua eficiência está ligada a uma melhor nutrição das culturas através do meio de cultura líquido, melhor oxigenação das culturas, diminuição da hiperhidricidade típica do meio de cultura líquido, melhoramento da qualidade dos propágulos e conseqüente sobrevivência durante a aclimatização, além da possibilidade da automação dos sistemas de propagação com um custo relativamente baixo (MURCH *et al.*, 2004).

Nos BIT os explantes são imersos no meio de cultura em intervalos regulares. O sistema de imersão temporária adaptado junto ao LFDGV/CCA/UFSC constitui-se em dois recipientes de vidro com o volume de dois litros cada, sendo que em um deles é armazenado o meio de cultura e no outro são colocados os explantes para multiplicação. Estes dois recipientes são interligados por uma mangueira de silicone autoclavável, na qual passa o meio de cultura. O sistema é dotado de um moto-compressor de ar que, quando acionado, faz com que o meio de cultura seja direcionado por pressão e passe para o recipiente contendo os explantes e depois volte novamente para o recipiente de depósito. O controle do

funcionamento do moto-compressor é feito por uma unidade temporizadora, que controla o tempo de imersão dos explantes e o intervalo de tempo entre as imersões. O ar injetado no sistema passa por uma membrana de filtro esterilizada de 0,22 μm (Figura 1).

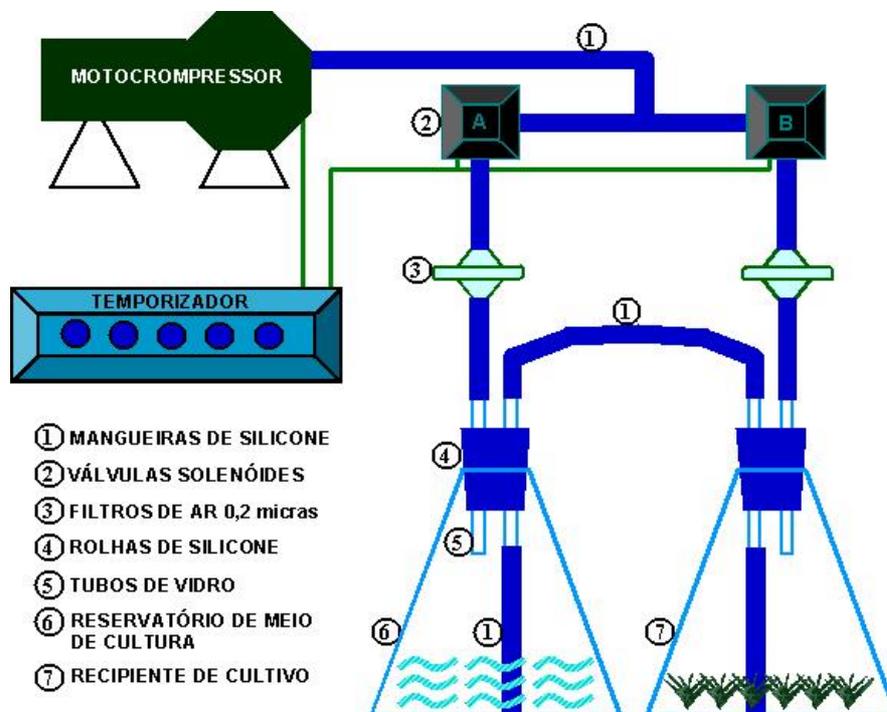


Figura 1. Biorreator de imersão temporária (LFDGV/CCA/UFSC).

No sistema de cultivo estacionário a hiperhidricidade ocorre devido ao contato permanente dos explantes com o meio de cultura, principalmente em meio líquido, o que pode causar também a anoxia das culturas. Estes problemas são reduzidos no sistema de imersão temporária pela diminuição do contato direto dos explantes com o meio de cultura.

O espaço físico neste sistema é aproveitado melhor pela cultura, pois todos os brotos têm acesso ao meio de cultura durante a imersão e todos os brotos têm acesso à atmosfera durante os períodos de espera, fazendo com que todo o volume do frasco possa ser ocupado pela cultura e não apenas a superfície inferior.

A renovação da atmosfera do recipiente de cultivo possibilita a remoção dos gases eliminados pelas plantas, os quais podem ter efeito inibidor ao crescimento; além disto, a renovação do CO_2 do recipiente pode proporcionar um incremento no nível de fotossíntese *in vitro*, desde que a luminosidade seja adequada. Portanto a constante renovação do ar durante o período de transferência do meio, podem eliminar os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas que normalmente se acumulam na fase gasosa dos sistemas.

O sistema de imersão temporária combina as vantagens dos meios sólido e líquido. O meio de cultura sólido permite aeração das culturas, porém não proporciona um total contato

com os nutrientes do meio. O meio de cultura líquido por sua vez permite uma eficiente nutrição, entretanto a hiperhidricidade está freqüentemente presente nas culturas (SMITH & SPOOMER, 1995). Isto é verdadeiro para bromélias, já que é comum o surgimento de hiperhidricidade em culturas do sistema convencional onde os explantes ficam em contato direto como meio de cultura durante todo o tempo de cultivo. Entretanto, nos BIT de imersão temporária este fenômeno não foi observado em bromeliáceas.

Na utilização de biorreatores de imersão temporária para o cultivo da bananeira, foram reportadas altas taxas de proliferação, bem como um aumento no peso seco dos brotos (TEISSON & ALVARD, 1995). A bananeira variedade Terra apresentou maior eficiência na produção de biomassa, maior número de brotos viáveis à aclimatização, e maior crescimento dos explantes nos BIT quando comparado com o sistema tradicional (LEMOS *et al.*, 2001).

Em cana-de-açúcar, foi obtida a maior taxa de multiplicação (57,8 brotos) com o uso de 3,4 μM de PBZ em BIT, em relação ao meio de cultura isento de PBZ (23,9 brotos) (LORENZO *et al.*, 1998). Em bromélias relatou-se um aumento na taxa de multiplicação de brotos de *Aechmea blumnavii*, *Cryptanthus bromelioides* e *Neoregelia carolina* após 60 dias de cultivo em imersão temporária, com uso de fitorreguladores como ANA, BAP e PBZ (DAQUINTA *et al.*, 1999).

No sistema de cultura estacionária com abacaxi (*Ananas comosus*), em meio de cultura MS adicionado de ANA (2 μM) e BAP (4 μM), foram obtidos 6,4 brotos/explante. Resultados estes, superiores aqueles observados com o meio de cultura suplementado com PBZ. Já no sistema de imersão temporária, o meio de cultura MS suplementado com ANA (2 μM), BAP (4 μM) e PBZ (6 μM) apresentou os melhores resultados, atingindo a taxa média de 172,3 brotos/explante (FEUSER *et al.*, 2000). Para esta mesma espécie, o sistema de imersão temporária resultou em 78,9% das brotações com potencial para a aclimatização, e uma taxa de sobrevivência de 63,6% (ESCALONA *et al.*, 1997).

LORENZO *et al.*, (2001), utilizando o sistema de imersão temporária com intervalos de três horas e tempo de imersão de dois minutos, com adição do fitorregulador PBZ (1 mg.L^{-1}) ao meio de cultura MS, obtiveram bons resultados na micropropagação de cana de açúcar. Neste caso, observaram também que o sistema de imersão temporária e o fitorregulador PBZ promoveram uma maior excreção de compostos fenólicos para o meio de cultivo, o que favoreceu a proliferação *in vitro* desta espécie.

Ainda com o PBZ (4 μM) e biorreatores de imersão temporária, RECH FILHO *et al.* (2003a) obtiveram um aumento significativo na taxa proliferativa da bromélia *Vriesea reitzii* (73,05 brotos/broto/100 dias de cultivo). Neste trabalho, a adição de AG_3 ao meio de cultura

mostrou eficiência no alongamento dos brotos, onde foi observado 30,50% e 14,25% de brotos com altura entre 1,1 e 2,0 cm em meio de cultura com e sem AG₃, respectivamente. Brotos com altura entre 1,5 e 2,0 cm obtidos em meio de cultura com PBZ apresentaram 100% de sobrevivência quando submetidos a aclimatização em substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fertil® (50%).

Em escala comercial, os BIT têm demonstrado sucesso na produção massal de plantas como em *Coffea arabica* (CATIE, 2003) e clones de *Eucalyptus spp.* (MCALISTER *et al.* 2002).

Um dos maiores benefícios comprovados para o sistema de imersão temporária está no aumento significativo da multiplicação do abacaxizeiro, cerca de 20 vezes maior quando comparado a métodos convencionalmente utilizados (FEUSER *et al.*, 2001). Um novo estudo de FEUSER *et al.*, (2003) ainda com a cultura do abacaxi, revelou que as culturas geradas em biorreatores de imersão temporária apresentavam aproximadamente a metade das taxas de variação somaclonal encontradas no sistema estacionário de micropropagação.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho objetivou:

- a) Determinar fatores associados às taxas de proliferação de brotos na micropropagação de bromélias, baseados nos sistemas de cultura imersão temporária e estacionária;
- b) Estudar os efeitos dos fitorreguladores ANA, BAP e PBZ, adicionados ao meio de cultura MS, na multiplicação de brotos nos sistemas de imersão temporária e estacionária de cultivo;
- c) Estudar a influência do fitorregulador PBZ na aclimatização de brotos gerados no sistema de imersão temporária de cultivo.
- d) Avaliar a influência dos fenóis totais no meio de cultura, na proliferação *in vitro* de bromélias.
- e) Consolidar protocolos de micropropagação de bromélias com a utilização dos BIT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Introdução *in vitro*

Sementes de *Aechmea fasciata* e *Vriesea brusquensis* foram submetidas a um processo de desinfestação em água contendo detergente Twen-20® durante 10 minutos, posteriormente em álcool 70% durante dois minutos; Hipoclorito de Sódio a 1% durante 20 minutos, e finalmente três lavagens em água destilada autoclavada. As sementes foram assepticamente inoculadas em frascos de 300 mL (20 sementes/frasco) contendo 20 mL de meio de cultura geleificado com ágar (0,7%), composto por sais de MS adicionado de 3% de sacarose e vitaminas de Morel (1951), isento de fitorreguladores. Aos 100 dias a taxa proliferativa foi avaliada, onde foram analisadas três repetições e cinco unidades amostrais por repetição. Cada unidade amostral perfazia 100 sementes.

3.1.2. Multiplicação das culturas

Plântulas de *A. fasciata* e *V. brusquensis*, oriundas da germinação *in vitro* de sementes foram submetidas à multiplicação em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido composto por sais de MS adicionado de 3% de sacarose e vitaminas de Morel, suplementado com os fitorreguladores ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M). Foram inoculadas cinco plântulas por frasco, e as culturas permaneceram nestas condições durante dois sub-cultivos de 60 dias. Brotos oriundos desta fase foram sub-cultivados em meio de cultura líquido composto pela formulação salina MS adicionada de 3% de sacarose e vitaminas de Morel, isento de fitorreguladores, durante 60 dias, sendo então, utilizados nos experimentos de proliferação *in vitro*.

Aos 180 dias desta etapa, a taxa proliferativa (brotos/explante) foi avaliada, considerando-se quatro repetições e cinco unidades amostrais (cinco frascos) por espécie.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 12 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, umidade relativa de 60 \pm 5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 μ mol.m⁻².s⁻¹ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.2. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação *in vitro* de *A. fasciata*

Brotos de *A. fasciata* com altura média de 1,5 cm, provenientes do sistema convencional de cultivo *in vitro*, em meio de cultura MS líquido isento de fitorreguladores, foram utilizados na condução dos experimentos.

Os brotos foram individualizados e inoculados em unidades dos biorreatores de imersão temporária (Figura 1) contendo 480 mL de meio de cultura, sendo paralelamente inoculados em frascos do sistema convencional (300 mL) contendo 16 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o MS líquido adicionado de sacarose (3%) e vitaminas de Morel, suplementado com PBZ (0; 2; 4 e 6 μ M).

Foram inoculados 30 brotos em cada unidade dos BIT e um broto em cada frasco do sistema convencional, com a finalidade de equiparar todos os tratamentos à 16 mL de meio de cultura por explante. Cada unidade dos BIT e quatro frascos do sistema convencional perfaziam uma repetição. O experimento foi conduzido em um delineamento completo casualizado com oito tratamentos, três repetições e quatro unidades amostrais por repetição.

O intervalo de imersão utilizado foi de três horas, com imersões de um minuto. Aos 80 dias de cultivo, avaliou-se a taxa proliferativa, a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm) e os fenóis totais do meio de cultura.

Para determinação dos fenóis totais adaptou-se a metodologia de LORENZO *et al.*, (2001), onde 0,6 mL de meio de cultura filtrado (papel filtro 0,2 μ) foram adicionados a 1,8 mL de água destilada e 0,24 mL do reagente Folin & Ciocalteau (50% v/v). A solução foi agitada, e após cinco minutos 0,48 mL de Carbonato de Sódio (solução saturada) foram adicionados, agitando-se novamente, e então, após uma hora de permanência no escuro, a leitura a 725 nm foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-1203.

Nas avaliações de proliferação e altura dos brotos foram utilizados quatro frascos para cada repetição do sistema convencional e paralelamente quatro aglomerados (cada aglomerado resultado da proliferação de um broto inoculado) em cada unidade dos BIT.

Brotos gerados neste experimento foram sub-cultivados em frascos do sistema convencional (300 mL) contendo 20 mL de meio de cultura MS líquido adicionado de sacarose (3%) e vitaminas de Morel, isento de fitorreguladores. Foram inoculados cinco brotos por frasco, onde para cada tratamento do experimento anterior foram estabelecidas quatro repetições com quatro unidades amostrais (16 frascos). Aos 90 dias (dois sub-cultivos de 45 dias) de cultivo avaliou-se a taxa média de proliferação e a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm).

Além disso, em outro experimento paralelo de sub-cultivo, foram inoculados dez brotos por frasco do sistema convencional (300 mL) contendo 20 mL de meio de cultura MS líquido adicionado de sacarose (3%) e vitaminas de Morel, isento de fitorreguladores. Os brotos utilizados eram oriundos das diferentes suplementações de PBZ nos biorreatores de imersão temporária. O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado, com três repetições e cinco unidades amostrais para cada proveniência de PBZ. O mesmo foi avaliado quanto à taxa de sobrevivência dos explantes 90 dias após a inoculação.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 20 minutos nos biorreatores de imersão temporária e 12 minutos no sistema convencional. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.3. Efeito do volume e renovação do meio de cultura na proliferação *in vitro* de *A. fasciata*

Os resultados obtidos no experimento de avaliação dos efeitos do PBZ e sistema de cultivo possibilitaram e criaram a necessidade da elucidação dos efeitos do volume de meio de cultura por explante, bem como sua renovação ao longo do cultivo.

Desta maneira, brotos da espécie *A. fasciata* com altura média de 1,5 cm, provenientes do sistema de cultivo convencional *in vitro* em meio de cultura MS líquido isento de fitorreguladores, foram individualizados e inoculados em unidades dos biorreatores de imersão temporária (Figura 1) contendo 240 e 480 mL de meio de cultura, bem como em frascos do sistema convencional (300 mL) contendo 16 mL de meio de cultura. Na constituição do meio de cultura (líquido) foram utilizados os sais de MS, adicionados de sacarose (3%) e vitaminas de Morel, suplementados com PBZ (0 e 2 μM).

Foram inoculados 30 brotos em cada unidade dos BIT (8 e 16 mL/explante) e um broto em cada frasco do sistema convencional (16 mL/explante). Aos 30 e 60 dias de cultivo três repetições de cada sistema de cultivo e quantidade de meio/explante, foram sub-cultivadas para meio de cultura MS líquido isento de fitorreguladores, respeitando o mesmo volume de meio/explante da primeira inoculação.

O intervalo de imersão utilizado foi de três horas, com imersões de um minuto. O experimento foi conduzido em um delineamento completo casualizado com dezoito tratamentos, três repetições e dez unidades amostrais (brotos) por repetição. Aos 30, 60 e 90 dias os fenóis totais do meio de cultura foram avaliados (LORENZO *et al.*, 2001 – item 3.2), e aos 90 dias a taxa proliferativa e a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm) também foram avaliados.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 20 minutos nos biorreatores de imersão temporária e 12 minutos no sistema convencional. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.4. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação *in vitro* de *V. brusquensis*

Brotos de *V. brusquensis* com altura média de 1,5 cm, provenientes do sistema convencional de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS líquido isento de fitoreguladores foram utilizados na elaboração do experimento.

Os brotos foram individualizados e inoculados em unidades dos biorreatores de imersão temporária (Figura 3) contendo 480 mL de meio de cultura, bem como em frascos do sistema convencional (300 mL) contendo 16 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o MS líquido adicionado de sacarose (3%) e vitaminas de Morel, suplementado com PBZ (0; 1; 2; 3; 4 e 5 μM).

Foram inoculados 30 brotos em cada unidade dos BIT, e um broto em cada frasco do sistema convencional. O experimento foi conduzido em um delineamento completo casualizado com 12 tratamentos, três repetições e dez unidades amostrais por repetição.

O intervalo de imersão utilizado foi de três horas, com imersões de um minuto. Aos 95 dias de cultivo avaliou-se a taxa proliferativa e a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm). Foram utilizados para a avaliação dez frascos de cada repetição do sistema convencional e paralelamente dez aglomerados (cada aglomerado resultado da proliferação de um broto inoculado) em cada unidade dos BIT.

Brotos gerados nos BIT em meio de cultura MS suplementado de PBZ (0 e 2 μM) foram sub-cultivados em frascos de 300 mL (dois brotos/frasco) contendo 20 mL de meio de

cultura MS líquido adicionado de sacarose (3%) e vitamina de Morel, isento de fitorreguladores. Este experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado com dois tratamentos, três repetições e dez unidades amostrais por repetição. Aos 80 dias (dois sub-cultivos de 40 dias) foram avaliadas a taxa proliferativa e a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm).

Os meios de cultura utilizados nos experimentos sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 20 minutos nos biorreatores de imersão temporária e 12 minutos no sistema convencional. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.5. Aclimatização das culturas

Brotos de *V. brusquensis* e *A. fasciata* provenientes do sistema de cultivo *in vitro* em BIT contendo meio de cultura MS suplementado com PBZ (0 e 2 μM) que apresentavam altura entre 1,51 e 3,0 cm foram submetidas ao processo de aclimatização em bandejas de isopor com 72 células (120 cm^3), contendo substrato composto por fertilizante organomineral turfa fértil® (05-02-05) (50%) e casca de arroz carbonizada (50%). As bandejas foram acondicionadas em caixas plásticas com tampa de vidro, sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura (25± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ - fitotron) controladas, com irrigação periódica durante 30 dias, onde gradativamente, a tampa foi aberta até atingir 1/3 da parte superior da caixa. Aos 30 dias as culturas foram transferidas para casa de vegetação com irrigação intermitente (nebulização) e cobertura de sombrite (50%).

O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado, constituído de quatro tratamentos, quatro repetições e dez unidades amostrais por repetição. Aos 60 dias as culturas foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência, e aos 100 dias quanto ao incremento em número de folhas.

Por ocasião da aclimatização das culturas avaliou-se o número de tricomas nas folhas da espécie *A. fasciata*. As contagens foram realizadas em folhas da porção mediana dos brotos em três pontos distintos das folhas, com três repetições e cinco unidades amostrais por

repetição. O campo visual de contagem no microscópio ótico (OLYMPUS CH30, ocular 10X; objetiva 10X – magnificação 100X) perfazia 2,54 mm².

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias SNK.

Ao atingirem altura superior a 10 cm (em média aos 150 dias da aclimatização) as plantas foram transplantadas para vasos plásticos (1,5 litros) contendo substrato: terra vermelha (25%), areia grossa (peneira 6) (25%) e fertilizante organomineral turfa fértil® (04-14-08) (25%) e casca de arroz carbonizada (25%). Os vasos foram acondicionados em bancadas da coleção de germoplasma sob condições de regas periódicas, com cobertura de sombrite 50%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Introdução *in vitro*

O início da germinação das sementes foi observado aos 30 e 25 dias, prolongando-se até 72 e 86 dias respectivamente para *V. brusquensis* e *A. fasciata*, respectivamente.

V. brusquensis apresentou um período de germinação de 42 dias, com 88,8% de viabilidade das sementes, valor este que diferiu estatisticamente (SNK: a) daqueles obtidos com *A. fasciata* que apresentou um período maior de germinação (61 dias), porém mostrou uma taxa menor de sobrevivência (84,3% - SNK: b).

As sementes de ambas as espécies foram coletadas na coleção de germoplasma de bromélias do LFDGV/CCA/UFSC. O sistema de introdução *in vitro* utilizado mostrou-se efetivo já que comprova a propagação destas espécies fora do seu ambiente natural de proliferação. Este aspecto é particularmente importante para a *V. brusquensis* uma bromélia endêmica do vale do rio Itajaí incluída na lista das espécies ameaçadas de extinção em SC (KLEIN, 1990).

Outro fator relevante é que a contaminação microbiológica não excedeu 5% nesta fase do cultivo ressaltando a efetividade do protocolo de introdução *in vitro* utilizado.

4.1.2. Multiplicação das culturas

Aos 180 dias da fase de multiplicação das culturas observaram-se taxas médias de proliferação na ordem de 3,31 (SNK: b) e 4,36 (SNK: a) brotos/explante para *V. brusquensis* e

A. fasciata, respectivamente. Apesar de *A. fasciata* apresentar uma menor viabilidade de sementes seu potencial de regeneração apresentou-se maior do que *V. brusquensis*.

DAL VESCO *et al.*, (2001a) obtiveram com a espécie *A. fasciata* uma taxa média de multiplicação de 11,9 brotos/explante, em resposta ao meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de ANA e 4 μ M de BAP. Utilizando também ANA e BAP, MERCIER & KERBAUY (1993) observaram o desenvolvimento de brotos adventícios em *Dyckia macedoi*. Esses dois reguladores de crescimento de plantas vêm sendo utilizados com muita eficiência na indução de brotos adventícios de bromélias cultivadas *in vitro* (MERCIER & KERBAUY, 1997), e, em conjunto com os sais de MS perfazem uma boa ferramenta para a multiplicação *in vitro* desta família. O ajuste das concentrações dos fitorreguladores e tempos de cultivos ideais para as diferentes espécies parece ainda um objeto de estudos mais aprofundados.

Os brotos gerados nesta fase de cultivo apresentaram praticamente 100% de aproveitamento no ato de sua utilização para os experimentos de micropropagação massal, o que confirma a efetividade do meio de cultura (MS) e dos fitorreguladores utilizados (ANA, BAP), para a obtenção de brotos padrões para a elaboração de experimentos.

4.2. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação *in vitro* de *A. fasciata*

Aos 80 dias da inoculação das culturas nos BIT e frascos do sistema convencional, observou-se uma maior taxa média de proliferação (38,42 brotos/explante) em meio de cultura MS líquido suplementado com 6 μ M de PBZ nos BIT. Esta taxa média de proliferação foi estatisticamente superior (SNK 95%) a todos os demais tratamentos (Tabela 1).

Em todas as concentrações de PBZ (0 a 6 μ M) adotadas no experimento, o sistema de cultivo em BIT mostrou-se superior (Tabela 1), proporcionando uma taxa média de proliferação de 28,17 brotos/explante, valor esse 56% superior à taxa média de proliferação no sistema convencional de cultivo *in vitro* em frascos de 300 mL.

Observou-se que a adição do PBZ ao meio de cultura líquido foi efetiva no aumento da taxa proliferativa *in vitro* de *A. fasciata* (Figura 7), onde todas as concentrações utilizadas apresentaram taxas médias de proliferação superiores aos tratamentos sem este fitorregulador (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do PBZ e do sistema de cultivo na taxa proliferativa *in vitro* e na concentração de fenóis totais em *A.fasciata* aos 80 dias de cultivo.

PBZ(mM)/ Sistema de Cultivo	Fenóis totais (ng/uL)			Proliferação (brotos/explante)		
	Imersão temporária	Imersão estacionária	PBZ	Imersão temporária	Imersão estacionária	PBZ
0	12,13de	21,71c	16,92b	6,83d	4,89d	5,86b
2	10,59e	34,44a	22,52a	34,25b	20,44c	27,35a
4	13,02d	32,09b	22,56a	33,17b	21,89c	27,53a
6	11,15de	33,17ab	22,16a	38,42a	24,89c	31,65a
Sistema de Cultivo	11,73B	30,35A		28,17A	18,03B	
	CV: 15,2%			CV: 14,9%		

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias. Comparações válidas somente dentro de fenóis totais ou proliferação.

Na micropropagação massal de abacaxi, a combinação de BIT com 1ml.L^{-1} de PBZ incrementou a taxa média de multiplicação para 68,8 brotos/explante quando comparado ao sistema convencional onde a taxa de proliferação foi de 11,1 brotos/explante. O PBZ controlou o crescimento dos brotos e induziu a proliferação das gemas axilares (ESCALONA *et al.*, 1999).

Outro resultado consistente observado em relação ao PBZ, foi que 100% dos brotos gerados no meio de cultura com este fitorregulador foram classificados na 1ª classe de altura, de 0 a 1,5 cm, diferentemente dos brotos gerados em meio de cultura isento deste fitorregulador, onde a frequência média foi de 61% nesta mesma classe de altura de brotos (Tabela 2). Estes resultados comprovam que a ação antigiberelínica deste fitorregulador pode melhorar a taxa proliferativa *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos na propagação de culturas como cana-de-açúcar (LORENZO *et al.*, 1998, 2001), abacaxi (FEUSER *et al.*, 2001; ESCALONA *et al.*, 1999), bromélias (*Vriesea gigantea*) (RECH FILHO *et al.*, 2003b).

Tabela 2. Efeito do PBZ na frequência dos brotos de *A.fasciata* nas diferentes classes de altura aos 80 dias de cultivo nos sistemas de imersão temporária (IT) e estacionária (IE).

PBZ (μM)	Sistema	Classes de altura	
		0-1,5 cM	1,51-3 cM
0	IT	60,83%	39,17%
	IE	61,01%	38,99%
2	IT	100%	0%
	IE	100%	0%
4	IT	100%	0%
	IE	100%	0%
6	IT	100%	0%
	IE	100%	0%

O experimento de sub-cultivo dos brotos gerados revelou um maior potencial residual de proliferação *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 2 μM de PBZ (Tabela 3), onde foi obtida uma taxa média de proliferação na ordem de 6,68 brotos/explante/90 dias, resultado estatisticamente superior as demais procedências. Ainda neste experimento, quando avaliada a interação dos dados foi possível observar que brotos procedentes de meio de cultura MS suplementado com 2 μM de PBZ, cultivados em BIT foram os que apresentaram o maior potencial regenerativo, apresentando uma taxa média de proliferação de 7,51 brotos/explante (Tabela 3 – Figura 7).

Tabela 3. Efeito residual do PBZ e do sistema de cultivo no sub-cultivo *in vitro* de *A. fasciata* em meio de cultura MS basal durante 90 dias. Os dados indicam a proliferação em brotos/explante.

PBZ (μM)	Sistema de cultivo (SC)		PBZ
	Imersão temporária	Imersão Estacionária	
0	3,48cd	2,83d	3,15C
2	7,51a	5,85b	6,68A
4	4,13b	4,01b	4,08B
6	1,16e	1,19e	1,18D
SC	4,07a	3,47b	CV: 14,8%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Num primeiro momento estes resultados geram um certo conflito, uma vez que, inicialmente, as mais elevadas taxas de proliferação foram obtidas em meio de cultura suplementado com 6 μM de PBZ, neste sub-cultivo o melhor potencial de proliferação foi obtido com 2 μM de PBZ. Entretanto, o experimento paralelo que avaliou a sobrevivência dos brotos gerados nos BIT com diferentes concentrações deste fitorregulador resolveu esta aparente contradição, já que a medida que os níveis de PBZ foram aumentados, a porcentagem de sobrevivência dos brotos gerados diminuiu num sub-cultivo subsequente aos BIT (Figura 2). O melhor modelo de regressão para explicar este comportamento foi uma regressão linear (Figura 2) que demonstra justamente o declínio gradativo da sobrevivência. Isso torna a suplementação com 2 μM de PBZ a melhor opção para multiplicação massal da espécie.

Ainda avaliando os efeitos do PBZ em sub-cultivo subsequente foi possível observar um crescimento normal dos brotos gerados em meio de cultura MS isento de fitorreguladores. Nesta ocasião verificou-se que os brotos gerados em todos os tratamentos, inclusive os procedentes de PBZ, apresentavam mais de 70% dos brotos na segunda classe de altura (1,51 a 3,0 cm) (Tabela 4). Apesar da proporção de brotos ser maior nesta classe de altura em

resposta aos tratamentos oriundos do meio de cultura isento de PBZ, os resultados indicam um retorno gradativo ao metabolismo que conduz ao crescimento normal das culturas, sem a necessidade da suplementação de outros fitorreguladores como o AG₃, que exerceria um efeito inverso ao do PBZ, inibindo seu efeito.

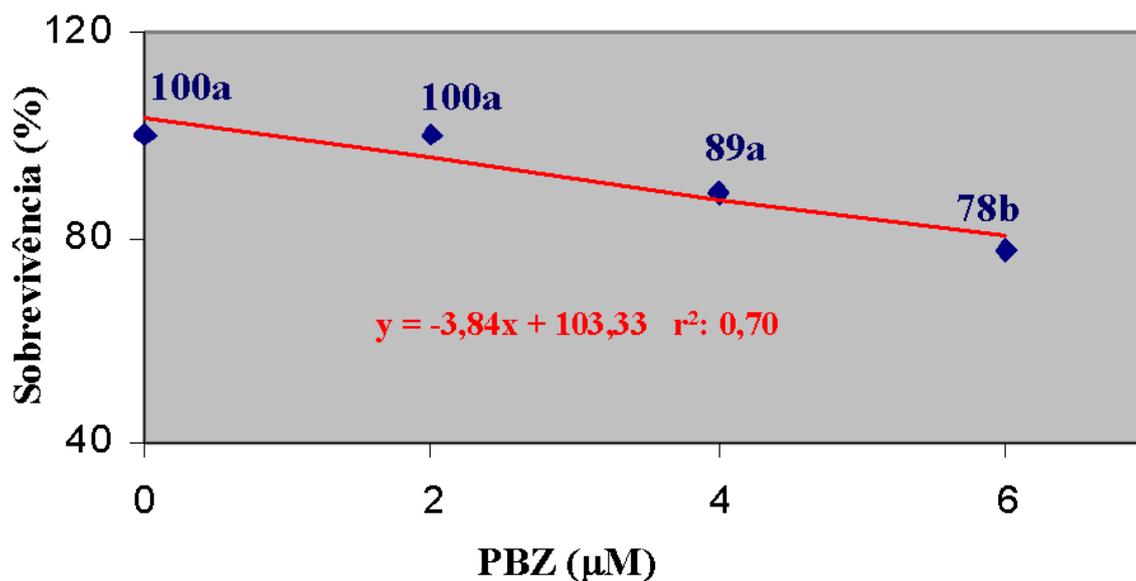


Figura 2. Efeito do PBZ na sobrevivência de brotos de *A. fasciata* gerados em BIT, aos 90 dias de sub-cultivo convencional em meio de cultura MS isento de fitorreguladores.

Outro aspecto bastante interessante observado referente ao sub-cultivo, foi que na rota do melhor tratamento obtido, ou seja, nos brotos oriundos dos BIT contendo meio de cultura MS líquido suplementado com 2 µM de PBZ, 80% dos brotos apresentaram altura entre 1,51 e 3 cm, estando aptos a aclimatização (Tabela 4, Figura 7). Este resultado define esta rota para propagação massal *in vitro* desta espécie como parte integrante de um protocolo de regeneração para esta espécie.

Na avaliação de fenóis totais excretados para o meio de cultura pode ser observado que nos BIT contendo meio de cultura suplementado com 2 µM de PBZ foi encontrada a menor concentração entre todos os tratamentos (10,59 ng/uL) (Tabela 1). Ácidos fenólicos são intermediários e precursores de várias etapas do metabolismo vegetal. Estes compostos estão envolvidos na regulação de crescimento de plantas, diferenciação celular e organogênese. A concentração dos fenóis é constantemente afetada por fatores internos e externos (LORENZO *et al.*, 2001).

A concentração de fenóis encontrada no sistema convencional de cultivo (30,35 ng/uL) foi 2,6 vezes maior do que nos BIT (11,73 ng/uL). Isto indica que a redução de

excreção de fenóis nos BIT pode estar relacionada com o alto potencial regenerativo obtido neste sistema de micropropagação massal de brotos de bromélias.

Tabela 4. Efeito residual do PBZ e sistemas de cultivo em imersão temporária (IT) e estacionária (IE) na frequência de brotos de *A.fasciata* nas diferentes classes de altura, aos 90 dias de cultivo em meio de cultura MS isento de fitorreguladores. Os dados indicam a proliferação em brotos/explante e sua respectiva porcentagem.

PBZ (μ M)	Sistema	Classes de altura							
		0-1,5 cM				1,51-3 cM			
		Brotos/explante	%	PBZ	Sistema	Brotos/explante	%	PBZ	Sistema
0	IT	0,33c	9,35	0,43C	0,79a	3,15c	90,65	2,73B	3,28a
	IE	0,53c	18,58			0,88a	2,3c		
2	IT	1,50a	19,97	1,58A		6,01a	80,03	5,10 ^A	
	IE	1,66a	28,42			4,19b	71,58		
4	IT	1,04b	25,08	1,03B		3,10c	74,92	3,04B	CV: 18,7%
	IE	1,03b	25,54			2,99c	74,46		
6	IT	0,29c	24,73	0,29C		0,88d	75,27	0,88C	
	IE	0,30c	25,26			0,89d	74,74		

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias. Válido para cada classe de altura.

Alguns estudos demonstram que a máxima proliferação de células e tecidos encontra-se associada a baixas concentrações de fenóis; outros, contudo, sugerem o contrário (LORENZO *et al.*, 2001). LEGRAND & BOUAZZA (1991) descreveram um aumento na formação de brotos de *Chicorium intybus* associado com um baixo conteúdo fenólico. Por outro lado, HERMAN (1991) observou que alta produção de ácido chiquímico estava positivamente correlacionada com a formação de brotos em *Pinus silvestris*, e que baixos níveis deste ácido estavam associados com uma baixa atividade metabólica e senescência. Em seu trabalho com a cana-de-açúcar LORENZO *et al.* (2001) demonstram que a cultura *in vitro* desta espécie está mais relacionada a este segundo grupo, onde os fatores promotores da proliferação de brotos *in vitro* (BIT, maior quantidade de meio por explante e PBZ – 1 mg.L⁻¹) também promoveram uma maior excreção fenólica para o meio de cultura.

A bromélia *A. fasciata* pareceu estar mais associada ao primeiro grupo, ou seja, a melhor taxa de multiplicação massal esteve associada a menor taxa de excreção de fenóis para o meio de cultura.

As concentrações de fenóis no meio de cultura são influenciadas pelo estágio de multiplicação das culturas, bem como pela quantidade de meio de cultura por explante (LORENZO *et al.* 2001). Assim o próximo experimento com *A. fasciata* tentou dar suporte às idéias formadas até aqui, elucidando melhor o comportamento da espécie a estes compostos.

4.3. Efeito do volume e renovação do meio de cultura na proliferação *in vitro* de *A.fasciata*

Ao longo das avaliações de proliferação e fenóis excretados para o meio de cultura foi possível verificar uma maior taxa proliferativa (34,27 brotos/explante) nas culturas que permaneceram 60 dias em meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de PBZ e simultaneamente sub-cultivadas para meio MS isento de fitorreguladores, em BIT, com uma relação de 16 mL de meio de cultura/explante.

A taxa média de proliferação obtida nas culturas que permaneceram 90 dias em meio de cultura suplementado com 2 μ M de PBZ (33,8 brotos/explante) não foi estatisticamente diferente daquela resultante do sub cultivo aos 60 dias. Entretanto, a quantidade de fenóis excretada para o meio de cultura foi significativamente superior (Tabela 5).

Os dados obtidos neste experimento demonstram que quanto maior o tempo de permanência das culturas em meio cultura líquido, suplementado ou não com PBZ, maior foi a excreção de fenóis para o meio de cultura (Tabela 5).

As culturas submetidas a um volume de meio de cultura de 8 ml/explante nos BIT, ou então ao sistema convencional de propagação com 16 ml de meio de cultura/explante, apresentaram uma menor taxa proliferativa (15,79 e 11,04 brotos/explante/90 dias, respectivamente) e uma maior concentração de fenóis totais no meio de cultura (26,26 e 23,63 ng/uL, respectivamente) em relação aos tratamentos dos BIT que continham 16 mL de meio de cultura/explante. Nestes, observou-se uma taxa média de proliferação de 19,7 brotos/explante/90 dias e uma concentração de fenóis de 18,61 ng/uL (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do PBZ, renovação de meio de cultura e volume de meio/explante na taxa proliferativa (PL) (brotos/explante) e fenóis totais (FT) (ng/uL) no cultivo *in vitro* de *A.fasciata*.

PBZ (μ M)	Sub- cultivo (dias)	Sistema de cultivo (Imersão)						PBZ		Sub-cultivo	
		Temporária				Estacionária					
		16mL (A)		8mL (B)		16mL (C)		PL	FT	PL	FT
		PL	FT	PL	FT	PL	FT				
0	30	6,03g	11,86gh	3,6h	6,82i	3,10h	14,61fg	4,53B	18,09B	11,98b	11,64c
	60	7,87f	10,88h	6,23g	17,02f	4,33h	16,95f			15,39a	22,16b
	90	8,03f	22,23e	5,0g	35,62c	5,9g	25,03d			15,81a	35,29a
2	30	28,2b	12,08gh	21,0c	6,53i	16,63e	16,73f	24,25A	27,97A	CV	
	60	34,27a	12,92gh	28,57b	40,73b	17,8ed	33,29c			PL	FT
	90	33,8a	41,67b	29,57b	50,83a	18,47d	35,15c				
Volume de meio		19,7a	18,61b	15,79ab	26,26a	11,04b	23,63a			18,9%	30,5%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias. As médias indicam comparação dentro de PL ou FT, e não entre eles.

Esses dados revelaram que existe uma certa correlação entre a concentração de fenóis no meio de cultura e a taxa proliferativa *in vitro*. Os tratamentos com menor volume de meio por explante acabaram apresentando uma maior concentração de fenóis e menor taxa proliferativa. Apesar da quantidade de meio de cultura por explante ser o mesmo em alguns tratamentos dos BIT e sistema convencional, os BIT apresentaram-se superiores, diminuindo a concentração de fenóis no meio e aumentando a taxa proliferativa (Tabela 5).

Estes resultados indicam que no sistema de imersão temporária existe uma renovação de atmosfera gasosa. Esta renovação juntamente com a agitação do meio de cultura causada pelo acionamento periódico do sistema, aparentemente reduz a concentração de compostos fenólicos que parecem ser prejudiciais a micropropagação das bromeliáceas.

O PBZ (2 μ M) foi outro fator que influenciou nos resultados, proporcionando uma maior (SNK, 95%) excreção de fenóis para o meio de cultura (27,97 ng/ μ L) frente aos meios isentos (18,09 ng/ μ L). Contudo, o PBZ aumentou a proliferação das culturas, proporcionando uma taxa média proliferativa (24,25 brotos/explante) superior (SNK, 95%) ao meio não suplementado (4,53 brotos/explante). Como a quantidade de brotos gerados em meios suplementados com este fitorregulador foi 5,35 vezes maior do que em meios isentos, a quantidade de meio por propágulo gerado tornou-se menor e isto é um forte indicador do aumento destes fenóis no meio de cultura.

Ainda buscando explicações para a questão de no experimento anterior, onde as culturas que estavam em níveis maiores de PBZ (4 e 6 μ M) apresentaram necrose e morte de brotos em sub-cultivo posterior, observou-se que não só o aumento da concentração, mas também o tempo de sub-cultivo interferiram na consolidação de um protocolo regenerativo de bromélias.

LORENZO et al., (2001) observaram que os BIT, a maior quantidade de meio de cultura/explante e o PBZ proporcionaram uma maior excreção de fenóis para o meio de cultura e uma conseqüente maior formação de brotos. O Ácido Gálico foi o composto predominante, e seu papel está ligado principalmente a proteção do AIA e a promoção da formação de brotos via modo de ação desta auxina.

O PBZ é uma mistura de enantiômeros 2R,3R com influência primária na síntese do esterol, e de enantiômeros 2S,3S com influência primária na síntese de giberelina (Smith *et al.*, 1990). Os enantiômeros 2R,3R inibem o citocromo P-450 dependente na reação de monooxigenase na biossíntese do esterol, enquanto os outros enantiômeros 2S,3S inibem outro citocromo P-450 enzima dependente, ent-kaureno oxidase, a qual cataliza a oxidação de ent-

kaureno para ácido ent-kaurenóico no caminho que conduz a síntese das giberelinas (ROBERTS & MATTHEWS, 1995).

A ação proposta para os enantiômeros 2S,3S parece ser bastante convincente, principalmente porque os efeitos morfológicos causados por este fitorregulador são bem visíveis em bromélias cultivadas *in vitro* (Figura 7). Geralmente ele promove uma diminuição no crescimento e as reservas poderiam ser direcionadas para as gemas axilares, promovendo um aumento na taxa proliferativa *in vitro*.

ROBERTS & MATTHEWS (1995), trabalhando com a preparação *in vitro* do crisântemo para transplante no solo, separam os dois enantiômeros e demonstraram que a perda de água por unidade de área foliar foi menor no tratamento com os enantiômeros 2S,3S, seguido pelo PBZ integral, enantiômeros 2R,3R e, finalmente, o tratamento de controle. Além disso, a distancia dos entrenós foi significativamente menor no tratamento com os enantiômeros 2S,3S.

Dos 20 aos 30 dias observou-se o início da multiplicação das culturas; dos 50 aos 65 dias a plena multiplicação, e a partir dos 75 dias ocorreu praticamente uma estabilização das culturas, com uma diminuição drástica na velocidade de multiplicação e escurecimento gradativo do meio de cultura dos tratamentos não sub-cultivados.

O escurecimento do meio de cultura no sub-cultivo de 90 dias está correlacionado com uma maior quantidade de fenóis no meio de cultura, e, juntamente com a diminuição na velocidade de multiplicação das culturas, evidencia que o sub-cultivo com 60 dias consolida-se como o melhor resultado para a propagação massal da espécie, já que a partir daí o meio de cultura em questão parece não ser mais efetivo no crescimento e desenvolvimento das culturas.

Isolando o melhor sistema de cultivo (BIT com 16 mL de meio/explante) e avaliando a excreção de fenóis para o meio de cultura, observou-se que quanto maior o tempo, maior a quantidade de fenóis excretados, principalmente no terço final dos tempos avaliados no experimento em questão (Figura 3). Os níveis alcançados aos 30 dias foram praticamente os mesmos dos 60 dias, não diferindo estatisticamente; já aos 90 dias os níveis encontrados foram 2,7 vezes maiores. Uma regressão linear comprova esta tendência de comportamento (Figura 3). Ao mesmo tempo, observou-se na regeneração de brotos que a medida que aumenta o tempo de cultivo a taxa de proliferação tende a diminuir. Uma regressão polinomial de segunda ordem comprova esta tendência de comportamento da espécie frente aos diferentes tempos de cultivo (Figura 3). Assim, consolida-se o sub-cultivo 60 dias como melhor opção para a propagação desta espécie.

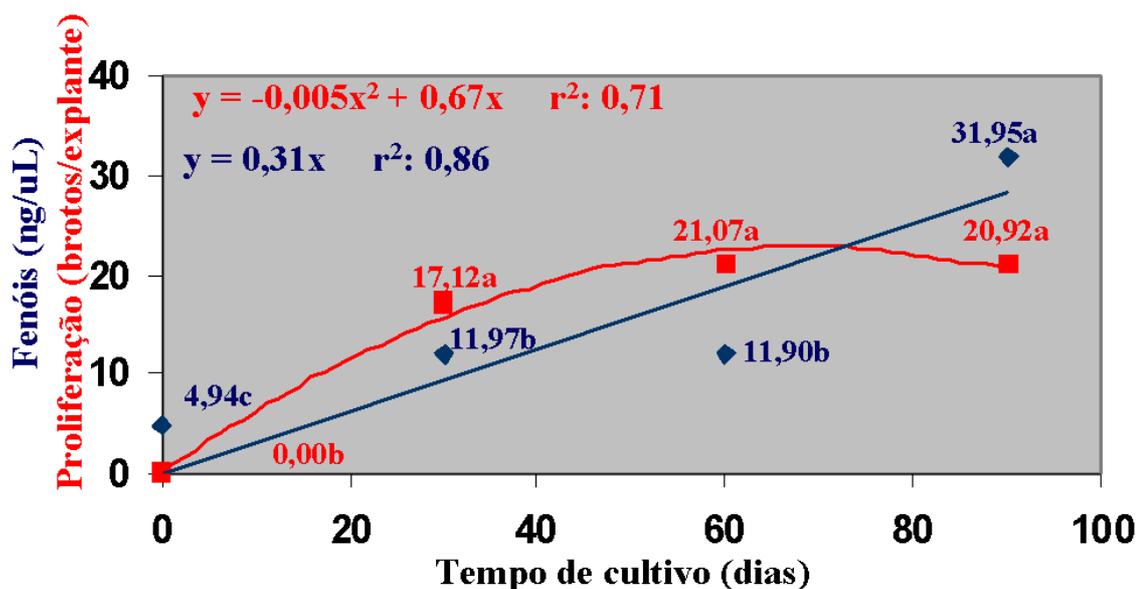


Figura 3. Efeito do tempo de sub-cultivo na excreção de fenóis (ng/uL) para o meio de cultura na micropropagação de *A. fasciata* em BIT, contendo 16 mL de meio de cultura/explante.

Novamente, como a exemplo do experimento anterior 100% dos brotos gerados com PBZ foram classificados na classe de altura de 0 a 1,5 cm, diferente dos brotos gerados sem a presença deste fitorregulador onde a frequência média foi de 56,91% nesta mesma classe de altura de brotos (Tabela 6). Estes resultados comprovam a ação antigiberelínica deste fitorregulador, efeito de fácil visualização quando se comparam culturas suplementadas ou não com PBZ (Figura 7).

Os efeitos de redução na altura e tamanho geral das plantas poderiam ser atribuídos à inibição da síntese de giberelinas proporcionada pelo PBZ. Estes efeitos foram relatados para culturas como cana-de-açúcar (LORENZO *et al.*, 1998, 2001), abacaxi (FEUSER *et al.*, 2001; ESCALONA *et al.*, 1999), bromélias (*V. gigantea* e *V. reitzii*) (RECH FILHO *et al.*, 2003b; 2003a). Entretanto, BAI & CHANEY (2001) revelam que estes efeitos podem estar associados a um ineficiente metabolismo promovido pelo retardante, onde uma menor taxa respiratória em plantas tratadas poderia conduzir a uma diminuição do ATP disponível para o metabolismo e crescimento.

BAI & CHANEY (2001) propuseram que o PBZ pode ter efeito sobre o Fe da citocromo oxidase no caminho respiratório da mitocôndria, da mesma maneira que atuaria sobre enzimas dependentes do citocromo P₄₅₀ na síntese de giberelinas. Além disso, a oxidação do NADH também é dependente de uma proteína Fe/S e P₄₅₀. Observou-se que o PBZ teve efeitos de estimulação (menores concentrações) e redução (maiores concentrações) em ambas, oxidação de NADH e redução do citocromo c.

Tabela 6. Efeito do PBZ, sub-cultivo e volume de meio/explante na porcentagem de freqüência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm na micropropagação *in vitro* de *A. fasciata* nos sistema de cultivo em imersão temporária e estacionária. Os dados expressam porcentagem.

PBZ	Sub-cultivo	Sistemas de cultivo (Imersão)			PBZ	Sub-cultivo
		Temporária		Estacionária		
		16 mL	8 mL	8 mL		
0	30	69,48b	53,08b	54,26b	56,91B	<u>79,47a</u>
	60	47,14b	50,26b	55,88c		<u>75,55a</u>
	90	58,82b	60,29b	63,02b		<u>80,36a</u>
2	30	100,00a	100,00a	100,00a	100,00A	
	60	100,00a	100,00a	100,00a		
	90	100,00a	100,00a	100,00a		
Volume de meio		79,24a	77,27a	78,86a		CV: 12,90%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Os principais inibidores conhecidos no caminho de transporte de elétrons são CO, KCN e NaN_3 , os quais se ligam ao Fe da citocromo c oxidase. O paclobutrazol também reduziu a atividade da citocromo c oxidase, contudo o modo de ação ou a posição de ligação não estão especificamente determinados (BAI & CHANEY, 2001). Os autores sugerem que os retardantes atuam de maneira similar aos inibidores conhecidos.

Tudo isto nos leva inferir que muitos trabalhos ainda devem ser feitos na busca de formulações específicas, como demonstra o caso do PBZ, que apesar de proporcionar excelentes resultados de multiplicação *in vitro* de bromélias ainda pode ser bastante explorado. Todavia, este trabalho consolida-se como componente de um protocolo regenerativo para a espécie *A.fasciata*, que será especificado no final deste capítulo.

Trabalhos futuros poderiam avaliar os efeitos do PBZ; 2R, 3R e 2S, 3S enantiômeros, separadamente. A adição dos compostos detectados na mesma concentração ao sistema de cultivo pode também ser uma linha de pesquisa interessante. Além disso, a quantificação de compostos em diferentes níveis de PBZ e diferentes tempos de cultivo poderá ser aperfeiçoada.

4.4. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação *in vitro* de *V.brusquensis*

A avaliação da taxa proliferativa das culturas aos 95 dias de cultivo revelou que o PBZ (2 μM) foi efetivo na multiplicação da espécie, proporcionando uma taxa média de proliferação na ordem de 11,92 brotos/explante, resultado este estatisticamente superior a todos as demais concentrações utilizadas no experimento (Tabela 7 – Figura 8).

Os resultados obtidos revelaram que até 2 μM de PBZ a taxa proliferativa aumentou, e em concentrações maiores (3 a 5 μM) declinou gradativamente. Uma regressão polinomial de segunda ordem (Figura 4) comprova o comportamento da proliferação frente as diferentes concentrações utilizadas no experimento. Pode-se observar que na concentração de 5 μM o PBZ foi menos efetivo do que no tratamento isento deste fitorregulador, indicando uma possível toxicidade acima deste nível.

Tabela 7. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na proliferação *in vitro* de *V. brusquensis* aos 95 dias de cultivo nos sistemas de cultivo em imersão temporária e estacionária.

PBZ (μM)	Sistema de cultivo (SC)		PBZ
	Imersão temporária	Imersão estacionária	
0	3,73d	3,77d	3,75C
1	10,33b	9,5b	9,92B
2	14,53a	9,30b	11,92A
3	10,6b	7,87c	9,23B
4	3,87d	3,77d	3,82C
5	3,67d	2,47d	2,97C
SC	7,76a	6,11b	CV: 17,1%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

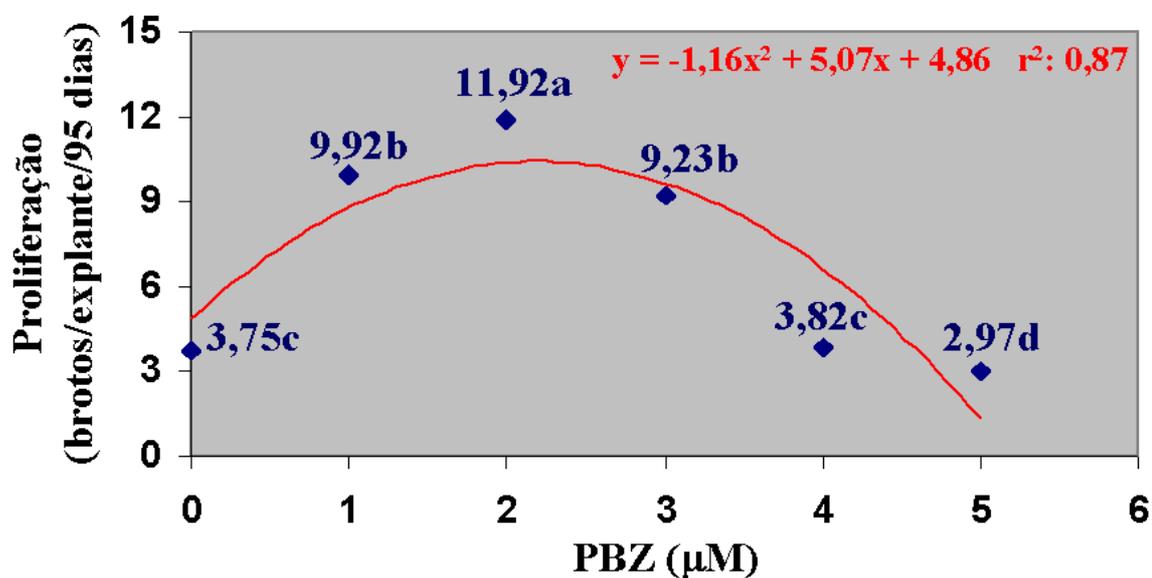


Figura 4. Efeito do PBZ na proliferação *in vitro* de *V. brusquensis*.

O sistema de cultivo em BIT mostrou-se efetivo para a multiplicação da espécie *V. brusquensis*, proporcionando uma taxa média de proliferação na ordem de 7,76 brotos/explante, estatisticamente superior ao sistema convencional que apresentou uma taxa média de 6,11 brotos/explante aos 95 dias de cultivo (Tabela 7 – Figura 8).

Segundo GEORGE (1993), os biorreatores, em geral, têm sido uma opção fortemente considerada quando se deseja aumentar a taxa de multiplicação, bem como diminuir o custo de produção de mudas originárias de embriões somáticos, suspensões celulares ou órgãos inteiros, uma vez que não é necessária a freqüente transferência dos explantes como no sistema tradicional. Este método baseia-se no princípio de que as plantas se desenvolvem melhor e mais rapidamente quando cultivadas em intervalos regulares de imersão em meio líquido seguido de drenagem. O maior contato das plantas com o meio de cultura aumenta, consideravelmente, a sua absorção, uma vez que os nutrientes podem ser absorvidos pelas folhas, caules e raízes. Em tese, as plantas absorvem mais nutrientes no sistema de imersão do que no tradicional, e conseqüentemente, produzem mais biomassa.

Na interação dos dados de suplementação de PBZ com sistemas de cultivo, observou-se como melhor tratamento o sistema de cultivo em BIT contendo meio de cultura MS líquido suplementado com 2 μ M de PBZ, o qual apresentou uma taxa proliferativa na ordem de 14,53 brotos/explante, resultado este estatisticamente superior a todos os demais tratamentos (Tabela 7).

A avaliação da freqüência dos brotos gerados nas diferentes classes de altura revelou, a exemplo do experimento com *A. fasciata*, que a grande maioria dos brotos gerados com o PBZ foram classificados na 1ª classe de altura, de 0 a 1,5 cm (Tabela 8), inclusive acima da concentração de 2 μ M 100% dos brotos gerados apresentavam-se nesta classe.

Os resultados obtidos reforçam que a ação antigiberelínica do PBZ pode melhorar a taxa proliferativa *in vitro*, já que o mesmo proporcionou uma redução no crescimento em altura dos brotos e uma conseqüente indução nas gemas axilares, aumentando a proliferação *in vitro* de *V. brusquensis*. Resultados semelhantes foram obtidos na propagação de outras bromeliáceas como *V. gigantea* (RECH FILHO *et al.*, 2003b), *V. reitzii* (RECH FILHO *et al.*, 2003a) e abacaxi (FEUSER *et al.*, 2001).

A micropropagação de bananeiras variedade “Terra” em BIT, apresentou maior eficiência na produção de biomassa, maior número de brotos viáveis à aclimatação e maior crescimento dos explantes quando comparado com o sistema tradicional (LEMOS *et al.*, 2001). TEISSON & ALVARD (1995) relataram melhores taxas de proliferação e um aumento no peso seco de brotos, quando cultivares de banana foram submetidos ao sistema de cultivo *in vitro* em biorreatores de imersão temporária.

Tabela 8. Efeito do PBZ e sistema de cultivo na frequência (%) e proliferação (PL) dos brotos de *V. brusquensis* nas diferentes classes de altura, aos 95 dias de cultivo nos sistemas de imersão temporária (IT) e estacionária (IE).

PBZ (μM)	Sistema	Classes de altura							
		0-1,5 cm				1,51-3 cm			
		PL	%	PBZ	Sistema	PL	%	PBZ	Sistema
0	IT	3,07d	82,3	3,03C	7,62a	0,66a	17,7	0,72A	0,13a
	IE	3,00d	79,6			5,93b	0,76a		20,2
1	IT	10,20b	98,7	9,70B	CV: 17,5%	0,13b	1,3	0,22B	
	IE	9,20b	96,8			0,30b	3,2		
2	IT	14,53a	100,0	11,92A		0,00b	0,0	0,00C	
	IE	9,30b	100,0			0,00b	0,0		
3	IT	10,6b	100,0	9,23B		0,00b	0,0	0,00C	
	IE	7,87c	100,0			0,00b	0,0		
4	IT	3,87d	100,0	3,82C		0,00b	0,0	0,00C	
	IE	3,77d	100,0			0,00b	0,0		
5	IT	3,47d	100,0	2,97C		0,00b	0,0	0,00C	
	IE	2,47d	100,0			0,00b	0,0		

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

LORENZO *et al.* (1998) trabalhando com a multiplicação da cana-de-açúcar em biorreatores de imersão temporária, obtiveram uma melhor taxa de multiplicação (57,8 brotos) com o uso de 3,4 μM de PBZ. Em bromélias, DAQUINTA *et al.*, (1999) relataram um aumento na taxa de multiplicação de brotos de *A. blumenavii*, *Cryptanthus bromelioides* e *Neoregelia carolinae* após 60 dias de cultivo em imersão temporária, com uso de ANA, BAP e PBZ.

O experimento de avaliação do efeito residual do PBZ revelou, também a exemplo da espécie *A. fasciata*, que quando as culturas foram sub-cultivadas para meio de cultura isento de fitorreguladores após serem submetidas a uma bateria de multiplicação em PBZ, retornaram ao seu estado normal de crescimento e desenvolvimento gradativamente, sem a necessidade da suplementação de outros fitorreguladores que reconstituam o metabolismo normal.

Neste caso, aos 80 dias de sub-cultivo em meio de cultura MS isento de fitorreguladores, as culturas provenientes dos BIT contendo meio de cultura MS suplementado com 2 μM de PBZ praticamente equipararam a porcentagem de brotos na classe de altura de 1,51 a 3 cm às culturas oriundas de meio isento. Assim, 88,08% das culturas provenientes de meio isento e 87,71% das culturas provenientes de meio suplementado com PBZ, apresentavam-se aptas processo de aclimatização (Tabela 9 – Figura 8).

Tabela 9. Efeito residual do PBZ e BIT na proliferação total e nas diferentes classes de altura no sub-cultivo *in vitro* de *V. brasquensis* em meio de cultura MS isento de fitorreguladores.

PBZ (μM)	Proliferação				
	total	0-1,5 cm	%	1,51-3 cm	%
0	1,93b	0,23b	11,92	1,70b	88,08
2	4,07a	0,50a	12,29	3,57a	87,71
CV: 15,3%					

OBS: Letras diferentes indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias na mesma coluna.

FEUSER *et al.*, (2001) observaram que apesar do PBZ aumentar a taxa de multiplicação do abacaxizeiro, foi necessário adicionar-se AG_3 ao meio de cultura para estimular o alongamento das brotações.

O PBZ imprimiu um efeito residual no sub-cultivo, proporcionando uma taxa média de proliferação de 4,07 brotos/explante/80 dias, superior (SNK, 95%) as culturas procedentes de meio de cultura MS isento que apresentaram uma taxa média proliferativa de 1,93 brotos/explante/ 80 dias (Tabela 9). Apesar do efeito residual ter imprimido uma maior taxa proliferativa (2,11 maior), a equiparação da porcentagem dos brotos na classe apta a aclimatização ocorreu no mesmo tempo de cultivo (Tabela 9). Esta é mais uma evidência de que as culturas obtidas em meio com PBZ não necessitam de adição de outros fitorreguladores para retornarem ao crescimento normal, ou seja, a reversão do efeito antigiberelínico ocorre gradativamente em meio de cultura isento de fitorreguladores, onde as culturas se tornam aptas à aclimatização normalmente.

Apesar de não terem sido elaborados e conduzidos experimentos referentes à porcentagem de sobrevivência das culturas ao longo dos sub-cultivos posteriores ao experimento com PBZ, as culturas foram mantidas em meio de cultura MS isento de fitorreguladores, onde então se observou que a partir da concentração de 4 μM parte das culturas apresentou necrose e senescência cerca de 100 dias após o sub-cultivo. Nas culturas provenientes da suplementação a partir do que 4 μM de PBZ, observou-se também um escurecimento no meio de cultura. Isso sugere a presença de compostos fenólicos prejudiciais ao desenvolvimento das culturas, como no caso de *A. fasciata*.

Os resultados obtidos permitiram definir as fases de multiplicação massal e preparação das culturas para aclimatização como componentes de um protocolo de micropropagação para a espécie a ser detalhado no final do capítulo.

4.5. Aclimatização das culturas

Aos 60 dias da aclimatização das culturas de *V. brasquensis* e *A. fasciata*, quando estas já haviam passado por uma fase de 30 dias em sala de crescimento com temperatura, luminosidade e irrigação controladas, mais 30 dias em casa de vegetação com sombrite (50%) e irrigação controlada, observou-se uma taxa de sobrevivência de 100% em brotos oriundos da micropropagação massal em BIT contendo meio de cultura MS suplementado com PBZ (2 µM), com sub-cultivo subsequente em meio MS isento de fitorreguladores.

O PBZ teve efeito positivo na aclimatização das duas espécies, já que brotos gerados em meio de cultura sem este fitorregulador apresentaram uma taxa média menor (76,25% - SNK, 95%) de sobrevivência (Tabela 10 – Figuras 7 e 8).

ESCALONA *et al.*,(1999) utilizando também BIT e PBZ na multiplicação do abacaxi, obtiveram 78,9% de plântulas competentes para a adaptação e 63,6% de sobrevivência.

Tabela 10. Efeito do PBZ sobre o incremento de folhas e a sobrevivência de brotos de *V. brasquensis* e *A. fasciata* gerados em BIT.

Espécie	Procedência PBZ (µM)	Sobrevivência (%)			Incremento de folhas (nr)		
<i>V.brasquensis</i>	0	77,5b	87,5A	76,25b	1,88b	2,15B	2,11b
	2	100,0a		100,0a	2,43ab		2,73a
<i>A.fasciata</i>	0	75,0b	88,75A	CV: 7,6%	2,35ab	2,69A	CV: 19,8%
	2	100,0a			3,03a		

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias. Comparações válidas dentro de sobrevivência ou incremento de folhas.

Os efeitos benéficos do PBZ, em relação à aclimatização, ou seja, em melhorar a resistência à dessecação vem sendo atribuídos a uma redução na relação peso fresco/seco dos brotos, um incremento na serosidade por unidade de área foliar, um melhoramento na habilidade do fechamento dos estômatos em resposta ao estres hídrico, além do encurtamento e engrossamento das raízes (ROBERTS & MATTHEWS, 1995; PODWYSZYNSKA, 1997).

Estudos mostraram que o PBZ presente no meio de enraizamento em maçã, crisântemo, rosa e beterraba, melhorou a sobrevivência após o transplante. Além disso, o PBZ reduziu a hiperidricidade aumentando a concentração de clorofila em tecidos foliares e promoveu a formação de raízes (PODWYSZYNSKA, 1997).

Os dados revelaram também que o PBZ promoveu um maior (SNK, 95%) incremento no número de folhas, onde brotos oriundos de meios contendo este fitorregulador apresentaram um incremento médio de 2,73 folhas/broto aos 100 dias da aclimatização (Tabela 10).

Plantas jovens de maçã tratadas com PBZ tiveram maior resistência à seca do que aquelas sem a presença do fitorregulador nos tratamentos. As plantas tratadas com PBZ tiveram uma diminuição no potencial de redução de água na folha e uma menor senescência foliar e morte (ZHU *et al.*, 2004).

A avaliação dos tricomas em *A. fasciata* revelou que os brotos que haviam sido cultivados em meio de cultura contendo PBZ nos BIT, apresentaram um maior número (SNK, 95%) destas estruturas (13,72a tricomas/mm²) em relação aos brotos oriundos de meio de cultura isento deste fitorregulador (9,33b tricomas/mm²) (Letras diferentes indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias - CV: 16,04%).

Bromeliáceas possuem em sua superfície foliar tricomas, também referidos por escamas petaladas ou foliares. Essas estruturas conferem às plantas capacidade singular de absorção de água e nutrientes, até mesmo do ar. Isso alerta para o cuidado quanto ao uso de defensivos químicos e adubos (PAULA, 2000). Os pêlos escamosos encontrados nas folhas das bromélias, são responsáveis pela alimentação, absorvendo a água e, com ela as substâncias nutritivas em solução (Reitz, 1983).

Os tricomas funcionam como válvulas dissipadoras de energia, alternadamente hidratando e protegendo contra perda de água, excesso de luz e calor. Na maioria das bromélias os tricomas foliares influenciam o controle de energia, recepção luminosa e retenção de água. Em espécies mais especializadas eles mediam a absorção de água e nutrição mineral (BENZING, 2000).

Em *A. fasciata*, a maior presença de tricomas em culturas que haviam sido suplementadas com PBZ (Figura 7) pode ter facilitado o processo de aclimatização dos brotos, contribuindo para melhor sobrevivência e incremento de folhas em relação às culturas não suplementadas com esse fitorregulador.

Tricomas foliares funcionam sob uma condição variada de ambientes, e sua estrutura e função variam de acordo com circunstâncias específicas. Estas estruturas nas bases das folhas ficam continuamente imersas em fluidos nutritivos. No extremo oposto sem a degradação da biomassa, solo ou produto das formigas estes tricomas sustentam centenas de espécies, na maioria rupícolas e epífitas. Em *A. bracteata* foram adicionados aminoácidos e albumina bovina nos tanques das plantas, e estas substâncias diminuíram com o tempo na solução aquosa do tanque (BENZING, 2000).

4.6. Os protocolos regenerativos

Um dos principais pré-requisitos para a produção massal de plantas em escala comercial é a obtenção rápida de material vegetal de alta qualidade e fácil adaptação a campo. Nos últimos anos os BIT vem surgindo como ferramentas chaves no processo de produção massal de mudas (MCALISTER *et al.* 2002; CATIE, 2003; MURCH *et al.*, 2004).

Neste sentido o trabalho com as bromeliáceas *A. fasciata* e *V. brusquensis* atingiu o objetivo proposto, consolidando protocolos de micropropagação massal para as duas espécies em questão(Figuras 5 e 6).

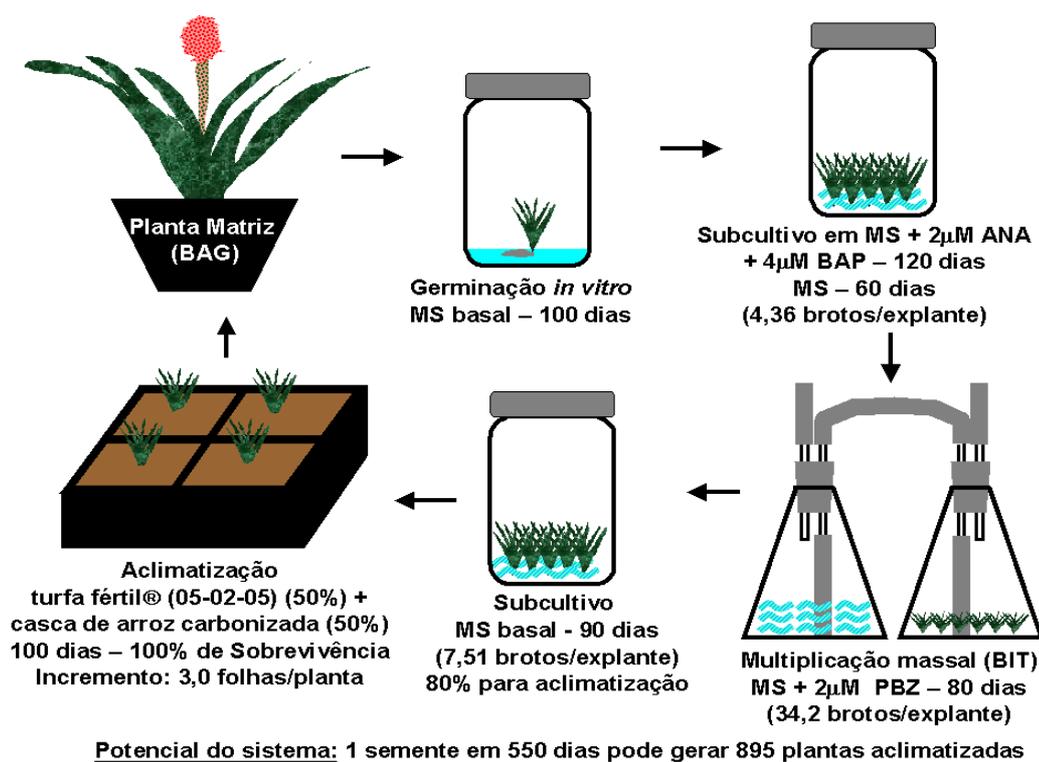


Figura 5. Protocolo de micropropagação massal para *Aechmea fasciata*.

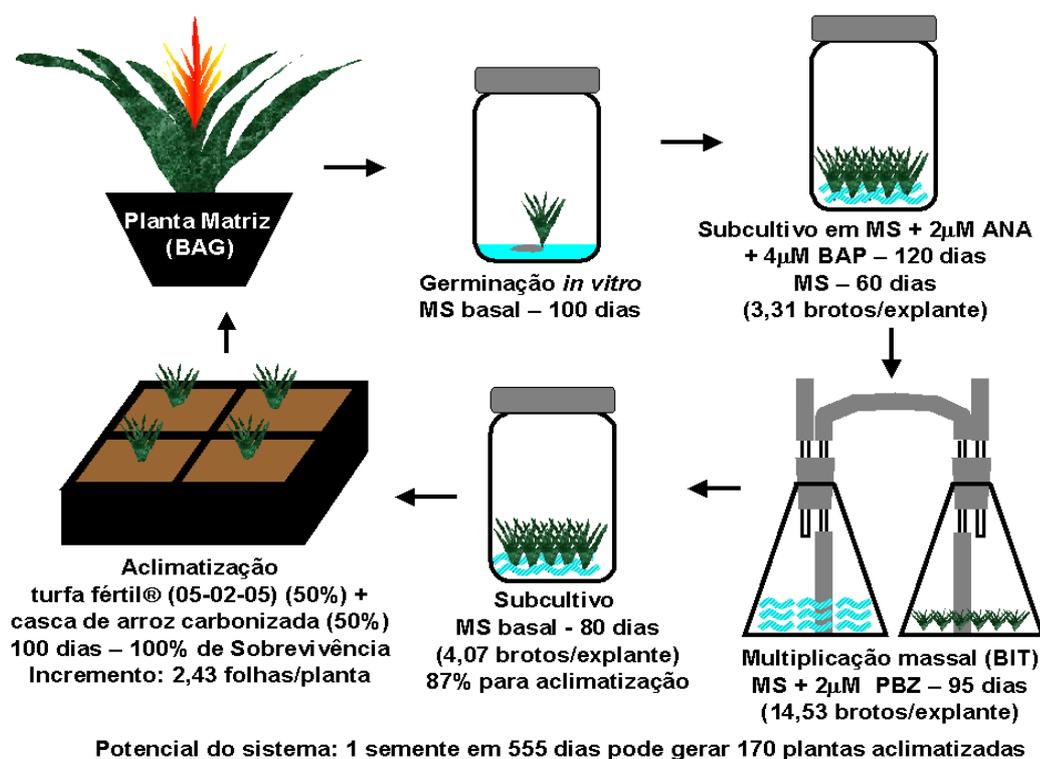


Figura 6. Protocolo de micropropagação massal para *Vriesea brusquensis*.

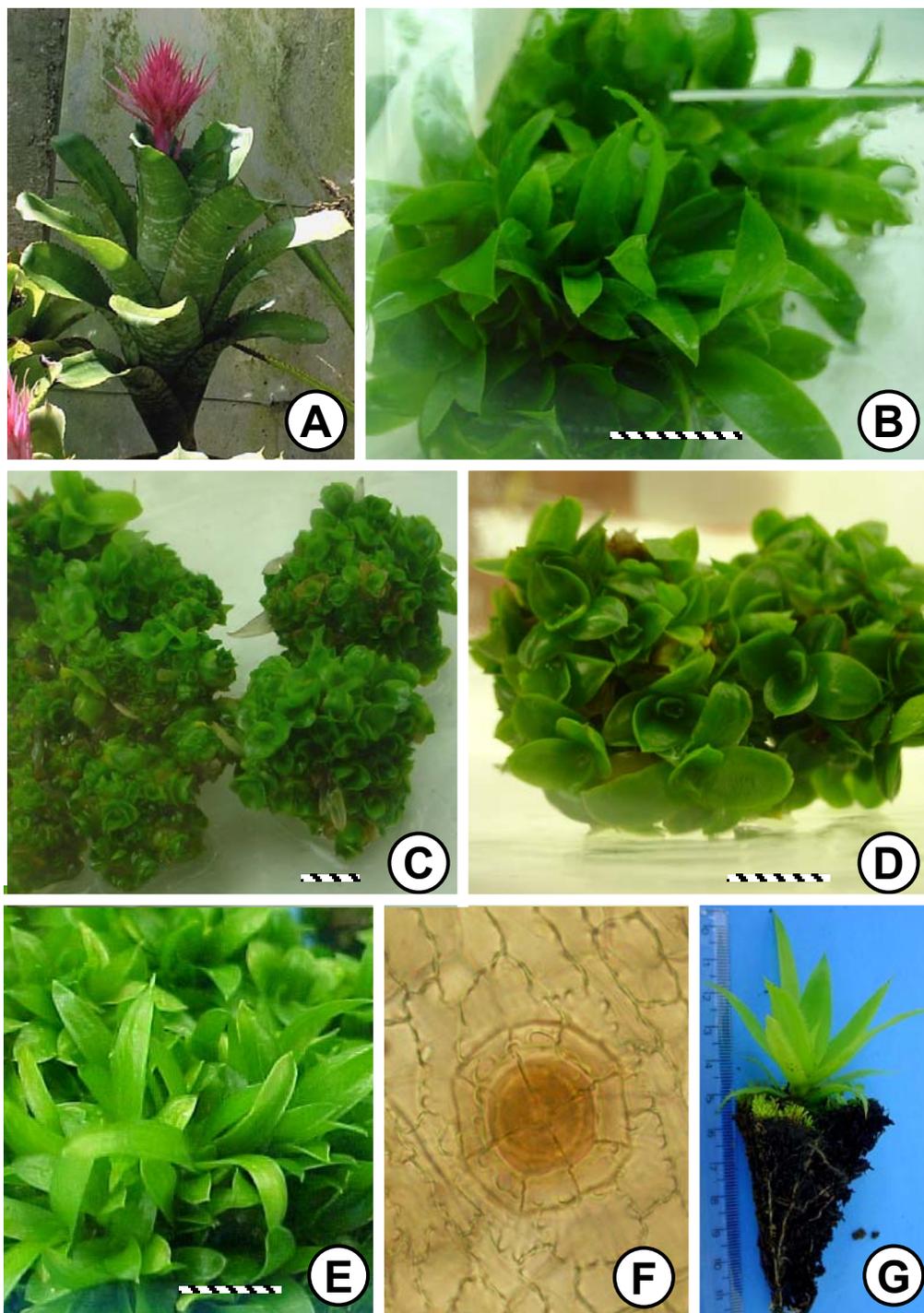


Figura 7. Micropropagação de *Aechmea fasciata*. **A.** Planta matriz. **B.** Brotos gerados em BIT contendo meio MS isento de fitorreguladores aos 80 dias. **C.** Brotos gerados em BIT contendo meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de PBZ aos 80 dias. **D.** Brotos gerados em BIT contendo meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de PBZ durante 60 dias + sub-cultivo em meio MS isento de fitorreguladores durante 30 dias. **E.** Brotos oriundos de C + 90 dias de cultivo em meio MS isento de fitorreguladores. **F.** Tricoma de E. **G.** Planta aclimatizada aos 100 dias, oriunda da rota C-E. Bar.:1cm.



Figura 8. Micropropagação de *Vriesea brusquensis*. **A.** Planta matriz. **B.** Brotos gerados em BIT contendo meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de PBZ. **C.** Brotos oriundos de B aos 40 dias de sub-cultivo em meio MS isento de fitorreguladores. **D.** Brotos oriundos de B aos 80 dias de sub-cultivo em meio MS isento de fitorreguladores. **E.** Aclimatização das culturas aos 100 dias, plantas oriundas da rota B-C-D. Bar.: 1cm.

5. CONCLUSÕES

- a) O sistema de estabelecimento *in vitro* através da germinação asséptica de sementes em meio de cultura MS basal mostra efetividade e comprova a possibilidade de propagação das espécies fora do seu ambiente natural de regeneração, já que os explantes eram oriundos de plantas matrizes *ex situ*;
- b) Os biorreatores de imersão temporária são ferramentas importantes na propagação massal de plantas, e a exemplo de outras culturas mostraram-se efetivos na micropropagação de propágulos das bromélias estudadas no presente trabalho;
- c) O fitorregulador PBZ consolidou-se como ferramenta chave no processo de multiplicação massal e estabelecimento *ex vitro* de bromélias geradas nos BIT, possibilitando, além de melhores taxas proliferativas, uma melhor padronização e sincronização do desenvolvimento dos propágulos obtidos;
- d) A excreção de compostos fenólicos para o meio de cultura prejudica a proliferação *in vitro* de *A. fasciata*, sendo que as melhores taxas proliferativas podem ser associadas a menor concentração destes compostos;
- e) A utilização de PBZ favorece a formação de tricomas em *A. fasciata* e a maior presença destas estruturas facilita o processo de aclimatização dos brotos, contribuindo para melhores sobrevivência e incremento de folhas em relação a culturas não suplementadas com esse fitorregulador.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C.. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation – Effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, 1993.

BAI, S.; CHANEY, W. Gibberellin synthesis inhibitors affect electron transport in plant mitochondria. **Plant Growth Regulation**, v.35, p.257-262, 2001.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge University Press, ISBN 0 521 43031 3, 690p., 2000.

CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; TEISSON, C. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.33-37, 1997.

CATIE. **Projects**. Massive micropropagation of F1 hybrids of *Coffea arabica* by somatic embryogenesis as support of the regional improvement programme. Disponível em: <<http://www.catie.ac.cr/research/research>>. Acesso em 15 de janeiro de 2003.

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 ornamentais em biofábricas. In: VIII Congresso Brasileiro De Fisiologia Vegetal, Ilhéus, BA, **Anais...**, p.278, 2001a.

DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALONA, M. Bromeliads micropropagation in temporary immersion system. In: BioVeg'99 - Internacional Workshop on Plant Biotechnology, Ciego de Avila, Cuba, **Anais...**, p.19-23, 1999.

ESCALONA, M.; GONZÁLEZ, B.L.; LORENZO, J.C.; DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; FUNDORA, Z.; ESPINOSA, D.; BORROTO, C. Propagación *in vitro* de la Piña en sistemas de inmersión temporal. In: BioVeg'97 – Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas, Ciego de Avila, Cuba, **Anais...**, p.23, 1997.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

FEUSER, S. **Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, CCB/UFSC). Florianópolis, SC, 70p., 2000.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.221-227, 2003.

FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência Comparativa dos Sistemas de Cultura Estacionária e Imersão Temporária para a Micropropagação do Abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.006-010, 2001.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The Technology, ISBN 0-9509325-4-X, London: Exegetics Ltd., England, 574p. 1993.

HERMAN, E.B. Regeneration, micropropagation and media. In: Herman, E.B. (ed). **Recent Advances in Plant Tissue Culture**, Agritech, Shrub Oak, NY, p.1988-1991, 1991.

KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção - Estado de Santa Catarina: mirtáceas e bromeliáceas**. IBGE, v.1, 283p, 1990.

LEGRAND, B.; BOUAZZA, A. Changes in peroxidase and IAA-oxidase activities during adventitious bud formation from small root explant of *Cichorium intybus* L.: influence of glucose. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.102-106, 1991.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; OLIVEIRA, J.G.S.; MAGALHÃES, V.S. Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.482-487, 2001.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.65, p.1-8, 2001.

LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.C.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.79-83, 1998.

MCALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M.P.; BLAKEWAY, F. Use of the Temporary Immersion Bioreactor System (RITA®) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). In: 1st International Symposium of 'Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants', Norway, **Abstracts...**, p.73, 2002.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, v.1, p.70-72, 1993.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajai, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin:Springer-Verlag. v.40, p.43-57, 1997.

MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. **American Journal Botanic**, n.38, p.141-143, 1951.

MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R.M.; SAXENA, P.K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.63-68, 2004.

PAULA, C.C. **Cultivo de bromélias**, Viçosa: Aprenda fácil, 139p., 2000.

PODWYSZYNSKA, M. Micropropagation of *Calathea ornata* Koern. **Biologia Plantarum**, v.39, n.2, p.79-186, 1997.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Vriesea reitzii* em biorreator de imersão temporária. In: I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras, MG, **Anais...**, p.212, 2003a.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; MÜLLER, C.V.; ALVES, G.M.; CUNHA, L.; GUERRA, M.P. Efeitos do Paclobutrazol na morfogênese *in vitro* de *Vriesea gigantea*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v15 (Suplemento, IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal), p.154, 2003b.

ROBERTS, A.; MATTHEWS, D. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil: 5. The 2S, 3S enantiomer of paclobutrazol improves resistance to desiccation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.191-193, 1995.

SANDÓVAL-YUGAR, E.W. **Elucidación dos pontos de controle da morfogênese e otimização de protocolos regenerativos *in vitro* de *Musa sp.* Cv. Grand Naine**, Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC), 115p., 2002.

SMITH, M.A.L.; SPOOMER, L.A. Vessels, gels, liquid media, and support systems. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, J. Smith, M.A.L. (eds). **Automation and environmental control in plant tissue culture**, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, p.371-405, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**, 2nd ed, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 792p., 1998.

TEISSON, C.; ALVARD, D. A New concept of Plant *in vitro* Cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: Terzi, M.; Cella, R.; Falavigna, A. (eds). **Current issues in plant molecular and cellular biology**, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.105-110, 1995.

TEISSON, C.; ALVARD, D. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. **Potato Research**, v.42, p.499-504, 1999.

ZHU, L.H.; VAN DE PEPPELB, A.; YUAN LIA, X.; WELANDERA, M. Changes of leaf water potential and endogenous cytokinins in young apple trees treated with or without paclobutrazol under drought conditions. **Scientia Horticulturae**, v.99, n.2, p.133-141, 2004.

ZIV, M. Bioreactor Technology for plant micropropagation. **Horticultural reviews**, v.24, p.1-30, 2000.

CAPÍTULO 2

UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE

BROMÉLIAS A PARTIR DE

MICROBROTOS

1. INTRODUÇÃO

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por MOREL (1960) ao multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões.

A tecnologia de sementes sintéticas surgiu como uma ferramenta chave no processo de multiplicação massal de plantas, principalmente na consolidação de protocolos de aplicação comercial, onde os fatores economia e tempo estão diretamente ligados ao sucesso da produção massal de propágulos em escala comercial.

Sementes sintéticas, artificiais ou somáticas, são estruturas análogas à semente verdadeira ou botânica, e consistem de um embrião somático envolto por uma ou mais camadas de compostos artificiais, formando uma cápsula. Esta cápsula serve de proteção ao embrião somático, contra danos mecânicos durante a armazenagem, transporte e semeadura (GRAY & PUROHIT, 1991; ONISHI *et al.*, 1994). O alginato de sódio apresenta boas características para o encapsulamento, possui boas propriedades geleificantes, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (GUERRA *et al.*, 1998).

Sementes sintéticas podem ser definidas como um embrião somático, dessecado ou não, e encapsulado com um endosperma sintético, contendo nutrientes, reservas e fungicidas (NIEVES *et al.*, 1998). Contudo, não somente embriões somáticos podem ser objetos desta tecnologia. Assim, SAKAMOTO *et al.*, (1995) estabeleceram o conceito de unidade encapsulável, a qual foi definida como o emprego de qualquer propágulo capaz de ser convertido em plântulas normais, com as seguintes características gerais: a) o tamanho da unidade deve estar dentro dos limites do encapsulamento (até 8 mm) e deve ser livre de calo, ou tecido do explante materno; b) o excesso de crescimento dos brotos deve ser suprimido até a formação endógena de raízes adventícias; c) devem possuir uma vigorosa habilidade de conversão em condições ambientais normais; e d) apresentar tolerância contra o estresse. Comparando estes requisitos com as características apresentadas pelos microbrotos obtidos no cultivo *in vitro* de *V. fosteriana* e *V. gigantea*, material vegetal de parte do presente trabalho, é possível inferir que os mesmos enquadram-se no conceito de unidade encapsulável.

Várias culturas não embriogênicas tem sido foco de estudo em trabalhos de encapsulamento com hidrogel (STANDARDI & PICCIONI, 1998). Os explantes variam de acordo com a espécie, sendo utilizados microbulbos em *Lilium longiflorum* (PICCIONI *et al.*, 1992; STANDARDI *et al.*, 1995), protocormos em *Cymbidium giganteum* (CORRIE & TANDON, 1993) e *Spathoglottis plicata* (STINGH, 1991), fragmentos de rizoma em *Nephroleps sp.* (STANDARDI *et al.*, 1994), gemas adventícias em *Boehmeria nivea* (CHEN

et al., 1996) e *Morus alba* (PATTANAİK & CHAND, 1996), gemas apicais e axilares em *Malus spp.* (PICCIONI, 1997; PICCIONI & STANDARDI, 1995), fragmentos de raízes em *Armoracia rusticana* (NAKASHIMADA *et al.*, 1995).

Para melhorar a emissão de radícula e conversão das sementes sintéticas, assim como o desenvolvimento de meristemas apicais e outras estruturas, alguns componentes nutricionais vêm sendo introduzidos na matriz do alginato de sódio (ARA *et al.*, 1999). Além deles, osmorreguladores como PEG, sorbitol e manitol (NIEVES *et al.*, 1998), fitorreguladores como BAP, ABA, AG₃ (MERKLE *et al.*, 1995), bem como antibióticos (MAMIYA & SAKAMOTO, 2001) também tem demonstrado eficiência na consolidação desta tecnologia. Em *Humulus lupulus*, por exemplo, a sacarose é considerada um crioprotetor (MARTÍNEZ *et al.*, 1999). NIEVES *et al.*, (2001) mostraram que o ABA tem efeito positivo na indução de embriões somáticos de cana-de-açúcar encapsulados.

Embriões somáticos de manga originários de explantes nucleares encapsulados numa matriz de alginato (2%) germinaram com sucesso em meio de cultura contendo AG₃ (2,9 µM). O ABA não teve efeito sobre a germinação dos embriões e desenvolvimento das plantas, ao contrário do AG₃, provocou um retardamento na germinação (ARA *et al.*, 1999).

A freqüência da regeneração de embriões somáticos de *Carica papaya* encapsulados em hidrogel foi significativamente afetada pela concentração de alginato de sódio, a presença de sais nutritivos na cápsula, bem como na duração do tempo de exposição ao cloreto de cálcio. Cápsulas constituídas numa matriz com 2,5% de alginato de sódio e metade dos sais de MS, complexadas durante 10 minutos em solução de cloreto de cálcio, apresentaram boa uniformidade. Nestas condições foi obtida uma boa freqüência de germinação (77,5%) dos embriões, que produziram plantas normais (CASTILLO *et al.*, 1998).

Outro componente que vem mostrando potencial na otimização da matriz de alginato é o carvão vegetal. Estudos demonstram que ele promove um incremento na respiração dos embriões somáticos, além de reter aglomerados de nutrientes, os quais são gradativamente liberados para o explante, favorecendo assim o estabelecimento das culturas (SAIPRASAD, 2001).

Em tangerina Cleópatra, o endosperma artificial composto por ABA e manitol, retardou a germinação e a conversão de embriões zigóticos. Contudo, quando este endosperma foi suplementado com aminoácidos (prolina, ácido glutâmico e arginina) observou-se uma aceleração no processo de conversão. Embriões zigóticos encapsulados germinaram após quatro dias em cultivo (NIEVES *et al.*, 1998).

A manutenção dos embriões somáticos em meio de cultura de pré-encapsulamento promoveu a emissão da radícula de *Asparagus officinalis* em substrato não estéril, e a porcentagem média de conversão da semente sintética com estas unidades de encapsulamento foi de 72% (MAMIYA & SAKAMOTO, 2001).

Várias inovações têm sido aplicadas à técnica de encapsulamento para a produção de sementes sintéticas. DUPUIS *et al.* (1994) estabeleceram o sistema de encapsulamento em cápsulas farmacêuticas. Outra inovação consiste em suspender o material vegetal numa solução que contém carboximetilcelulose e cloreto de cálcio sobre uma solução de alginato de sódio em agitação, resultando na formação de uma cápsula com matriz interna líquida. Esta técnica foi testada com cenoura, resultando em 100% de emissão de radícula das unidades encapsuladas (PATEL *et al.*, 2000).

Esta tecnologia pode também ser empregada em conjunto com a criopreservação na conservação *in vitro* de germoplasma (MARUYAMA *et al.*, 1997), diminuindo assim a vulnerabilidade a alterações climáticas, bem como a incidência de pragas e patógenos (PAUL *et al.*, 2000).

O encapsulamento dos embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* resultou em 44,4% de conversão a plântulas, sendo esta porcentagem dependente da qualidade dos embriões somáticos, assim como dos demais componentes da cápsula. Observou-se também que a utilização de um endosperma artificial promoveu a conversão a plântulas, aumentando a sobrevivência delas por mais tempo. A utilização do fitorregulador BAP e do osmorregulador sorbitol, adicionados ao endosperma artificial, melhorou a porcentagem de conversão. Outro fator relevante para a conversão dos embriões somáticos encapsulados como semente sintética foi a pré-conversão destas, utilizando BAP e AG₃ no meio de cultura (CANGAHUALA INOCENTE, 2002).

Os embriões somáticos de *F. sellowiana* podem ser empregados para a produção de sementes sintéticas por serem sensíveis à desidratação, por serem grandes e apresentarem fácil manipulação. Utilizando esta técnica, embriões somáticos de *F. sellowiana* foram mergulhados em solução de alginato de sódio (1%) e CaCl (50mM) resultando na formação de sementes. A aplicação de um pré-tratamento com KNO₃ (50 mM) facilitou a emissão de radícula de embriões somáticos encapsulados, resultando em 81,2% de cápsulas abertas, em comparação com o tratamento testemunha com água (GUERRA *et al.*, 2001).

GANAPATHI *et al.* (1992), obtiveram 100% de conversão a plântulas com o encapsulamento de brotações de bananeira cultivar Basrai. Contudo, esta conversão se deu em condições *in vitro* e na presença de meio de cultura indutivo.

Diversos estudos com suplementação nutritiva na matriz de alginato de sódio vêm sendo conduzidos. Contudo, muitos deles apontam para a necessidade de um aperfeiçoamento das quantidades efetivas de macro e micro nutrientes a serem lançados à matriz de alginato (PATTNAIK & CHAND, 2000; PICCIONI & STANDARDI, 1995). Íons mono e di-valentes dos macro e micronutrientes, por exemplo, podem interferir na consistência da matriz de alginato, causando uma pré-complexação (PICCIONI & STANDARDI, 1995).

SANDÓVAL-YUGAR (2002) observou que microbrotações de bananeira cultivar Grand Naine, se enquadraram no conceito de unidade encapsulável. Neste caso, o emprego do meio de cultura MS como endosperma artificial favoreceu significativamente o processo de manuseio e conversão de microbrotos em plântulas. Os microbrotos apresentaram reservas suficientes para romper a matriz de alginato da cápsula e foram capazes de converterem em plântulas sem tratamentos de descomplexação, fator este que reduz os custos e facilita o sistema de distribuição. A adição de carvão ativado e do fungicida Benomyl à matriz de alginato diminuiu a oxidação e a contaminação dos microbrotos, respectivamente.

Microbrotos de abacaxi em pré-tratamento de 12 horas em meio de cultura contendo mio-inositol, ANA (10,8 μM) e AIB (39,4 μM), quando encapsulados em matriz de alginato de sódio preparada com sais e vitaminas de MS, mio-inositol e sacarose, apresentaram 100% de conversão em meio de cultura MS adicionado de vitaminas MS, mio-inositol e sacarose, suplementado com ANA (9,67 μM), AIB (9,84 μM) e KIN (9,29 μM). Plantas produzidas *in vitro* por este protocolo, foram estabelecidas com sucesso a campo (SONEJI *et al.*, 2002).

O PBZ é um eficiente indutor de microbrotos em bromélias (RECH FILHO *et al.*, 2003b). O PBZ tem influência primária na inibição da síntese de giberelina (SMITH *et al.*, 1991). Os enantiômeros 2S,3S presentes em sua composição, inibem o caminho que conduz a síntese das giberelinas (ROBERTS & MATTHEWS, 1995).

Nos últimos anos, a tecnologia de sementes sintéticas/unidades encapsuláveis vem se revelando como ferramenta chave no estabelecimento de protocolos de micropropagação massal de plantas. Os principais potenciais deste sistema são a micropropagação em larga escala, manutenção da uniformidade genética das culturas, baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, além da possibilidade do estabelecimento dos propágulos direto a campo num estágio mais precoce do que em sistemas convencionais de propagação (SAIPRASAD, 2001). Entretanto, este último potencial parece ser o maior ponto crítico de controle da tecnologia, já que na maioria dos trabalhos o assunto é abordado apenas em condições de cultivo controlado.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho objetivou:

- a) Estudar métodos que viabilizem o encapsulamento de microbrotos de bromélias em hidrogel para a obtenção de unidades encapsuláveis;
- b) Estudar a influência dos fitorreguladores ANA, BAP, PBZ e AG₃ na sobrevivência das unidades encapsuláveis de bromélias, para promover estabelecimento inicial de brotos *ex vitro*;
- c) Consolidar protocolos de micropropagação de bromélias através do estabelecimento *ex vitro* via unidades encapsuláveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Introdução *in vitro*

Sementes de *V. fosteriana* e *V. gigantea* foram submetidas a um processo de desinfestação em água contendo detergente Twen 20 durante 10 minutos, álcool 70% durante dois minutos, Hipoclorito de Sódio 1% durante 20 minutos, e finalmente, três lavagens em água destilada autoclavada. As sementes foram assepticamente inoculadas em frascos de 300 mL (20 sementes/frasco) contendo 20 mL de meio de cultura geleificado com agar (0,7%), composto por sais de MS adicionado de 3% de sacarose, vitaminas de Morel, isento de fitorreguladores. Aos 130 dias a taxa proliferativa foi avaliada, onde foram analisadas três repetições e cinco unidades amostrais por repetição. Cada unidade amostral perfazia 100 sementes.

3.1.2. Multiplicação das culturas

Plântulas de *V. fosteriana* e *V. gigantea*, oriundas da germinação de sementes, foram submetidas à multiplicação em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura MS líquido, adicionado de 3% de sacarose, vitaminas de Morel (1951), suplementado com os fitorreguladores ANA (2µM) e BAP (4µM). Foram inoculadas cinco plântulas por frasco. As culturas permaneceram nestas condições durante dois sub-cultivos de 50 dias. Brotos oriundos desta fase foram sub-cultivados em meio de cultura MS líquido, adicionado de 3% de sacarose e vitaminas de Morel, isento de fitorreguladores durante 55 dias, sendo então, utilizados nos experimentos de proliferação *in vitro*.

Aos 155 dias desta etapa a taxa proliferativa (brotos/explante) foi avaliada, considerando-se quatro repetições e cinco unidades amostrais (cinco frascos) por espécie.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 12 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.2. Consolidação de um protocolo regenerativo para *V. fosteriana*

3.2.1. Micropropagação massal

Brotos de *V. fosteriana* com altura entre um e dois cm, oriundos do sistema convencional de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS isento de fitorreguladores, foram inoculados em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura MS líquido adicionado de 3% de sacarose e vitaminas de Morel, suplementado com diferentes níveis de PBZ (0,2,4,6 e 8 μM).

O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado com cinco tratamentos, quatro repetições e cinco unidades amostrais por repetição. Cada unidade amostral foi composta de um frasco contendo três explantes inoculados. Aos 120 dias da inoculação avaliou-se à taxa proliferativa (brotos/explante), bem como a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm).

Os meios de cultura sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 12 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.2.2. Estabelecimento *ex vitro* através de unidades encapsuláveis

Microbrotos com altura entre 0,5 e 1,0 cm, oriundos do experimento de multiplicação, foram submetidos à técnica de unidades encapsuláveis.

Culturas provenientes da multiplicação em meio de cultura MS suplementado com PBZ (0 e 4 μM) foram submetidas a uma fase de indução durante 10 dias em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura MS líquido, adicionado de 3% de sacarose, vitaminas de Morel, isento ou suplementado com o fitorregulador AG₃ (5 μM). Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 12 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5%, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Após esta etapa os microbrotos foram então individualizados e submetidos ao encapsulamento na matriz de alginato de sódio (1 ou 2%), contendo 50% dos sais de MS. A complexação das cápsulas foi realizada em solução de CaCl₂ (50 mM) durante 10 minutos. As unidades encapsuláveis foram submetidas à lavagem em água corrente durante um minuto e descomplexadas em solução de KNO₃ (100 mM) durante 20 minutos, sendo transplantadas em bandejas de isopor com 220 células (13 cm³) contendo vermiculita. As bandejas foram então acondicionadas em caixas plásticas com tampas de vidro, permanecendo durante 45 dias em sala de crescimento (fitotron) com temperatura (25± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) controladas, sob condições e regas periódicas com água contendo 20% dos sais de MS.

Após este período, as culturas foram transferidas para bandejas de isopor de 200 células (14 cm³) contendo substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fértil® (50%) sendo acondicionadas em casa de vegetação com cobertura de sombrite 50% e nebulização intermitente, durante 60 dias.

O experimento foi conduzido em um delineamento completo casualizado perfazendo um fatorial 2x2x2 com oito tratamentos, nove repetições e quatro unidades amostrais por repetição, sendo que cada unidade amostral perfazia uma unidade encapsulável. A porcentagem de sobrevivência das unidades encapsuláveis foi avaliada aos 45 dias. Além disso, o incremento médio de folhas no período de 45 a 105 dias foi avaliado.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.3. Consolidação de um protocolo regenerativo para *V. gigantea*

3.3.1. Micropropagação massal

Brotos de *V. gigantea*, com altura entre 1,0 e 2,0 cm, oriundos do sistema convencional de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS isento de fitorreguladores, foram inoculados em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura MS líquido adicionado de sacarose (3%), isento ou suplementado com os fitorreguladores ANA (2,0 μM), BAP (4,0 μM) e/ou PBZ (2,0; 4,0; 6,0 μM).

O experimento foi conduzido em um delineamento completamente casualizado, com oito tratamentos, três repetições e quatro unidades amostrais. Em cada frasco foram inoculados dois brotos, sendo que cada broto perfazia uma unidade amostral. Aos 100 dias foi avaliada a taxa de proliferação (brotos/explante), bem como a distribuição dos brotos em duas diferentes classes de altura (0 a 1,50 / 1,51 a 3,0 cm).

Os meios de cultura sempre tiveram seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121° C e 1 ATM durante 12 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, umidade relativa de 60 \pm 5%, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provenientes de lâmpadas fluorescentes de 18 W.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

3.3.2. Estabelecimento *ex vitro* através de unidades encapsuláveis

Microbrotos com altura entre 0,5 e 1,0 cm, oriundos do experimento de multiplicação, foram submetidos à técnica de unidades encapsuláveis.

Culturas provenientes da multiplicação em meio de cultura MS suplementado com ANA/BAP/PBZ (0:0:0; 2:4:0; 2:4:4; 0:0:4 μM) foram submetidas a uma fase de indução durante 10 dias em frascos de 300 mL contendo 15 mL de meio de cultura composto por sais de MS adicionado de 3% de sacarose, vitaminas de Morel, suplementado com o fitorregulador AG₃ (5 μM).

Após esta etapa os microbrotos foram então individualizados e submetidos ao encapsulamento na matriz de alginato de sódio 2%, contendo 50% dos sais de MS, adicionado ou não de carvão ativo (1%). A complexação das cápsulas foi realizada em solução de CaCl₂ (50 mM) durante 10 minutos. As unidades encapsuláveis foram submetidas à lavagem em água corrente durante um minuto e descomplexadas em solução de KNO₃ (100 mM) durante 20 minutos, sendo transplantadas em bandejas de isopor com 220 células (13 cm³) contendo

vermiculita. As bandejas foram então acondicionadas em caixas plásticas com tampas de vidro, permanecendo durante 50 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ controladas, sob condições e regas periódicas com uma solução contendo 20% dos sais de MS.

Após este período, as culturas foram transferidas para bandejas de isopor de 200 células (14 cm^3) contendo substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fértil® (50%) sendo acondicionadas em casa de vegetação com sombrite 50% e nebulização intermitente, durante 75 dias.

O experimento foi conduzido em um delineamento completo casualizado perfazendo um fatorial 4x2 com oito tratamentos, quatro repetições e cinco unidades amostrais por repetição, sendo que cada unidade amostral perfazia uma unidade encapsulável. A porcentagem de sobrevivência das unidades encapsuláveis foi avaliada aos 50 dias. Além disso, o incremento médio de folhas no período 50 a 125 dias foi avaliado.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de média SNK (95%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Introdução *in vitro*

O início da germinação das culturas foi observado aos 40 e 30 dias, prolongando-se até 100 e 75 dias para *V. fosteriana* e *V. gigantea* respectivamente. *V. fosteriana* apresentou um período de germinação de 60 dias, o maior das quatro espécies do presente trabalho, com porcentagem de germinação de 78,53%. Já *V. gigantea* apresentou um período menor de germinação (45 dias), entretanto a porcentagem de germinação não foi estatisticamente diferente (77,33% - SNK, 95%). A germinação média destas espécies foi menor do que as taxas obtidas para *V. brusquensis* e *A. fasciata*, nos protocolos regenerativos com BIT.

As sementes de ambas as espécies foram coletadas na coleção de germoplasma do LFDGV/CCA/UFSC. Entretanto, o sistema de introdução *in vitro* utilizado mostrou-se efetivo já que comprova a propagação destas espécies fora do seu ambiente natural de regeneração.

A introdução *in vitro* das culturas é uma das etapas mais importantes da micropropagação. A dificuldade maior nesta etapa reside no estabelecimento de culturas livres de contaminantes, sem causar a mortalidade dos tecidos. Tratamentos pré-determinados na planta matriz podem ajudar na obtenção de sucesso desta etapa, principalmente no que se

refere a microorganismos endógenos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A contaminação microbiológica não excedeu 5% nesta fase do cultivo reforçando a efetividade do protocolo, utilizado também para a introdução *in vitro* das espécies dos experimentos com BIT.

4.1.2. Multiplicação das culturas

Aos 155 dias da fase de multiplicação das culturas observaram-se taxas médias de proliferação na ordem de 3,57 e 3,33 brotos/explante para *V. fosteriana* e *V. gigantea*, respectivamente.

MERCIER & KERBAUY (1993) observaram o desenvolvimento de brotos adventícios em *Dyckia macedoi* formados em meio de cultura contendo ANA e BAP. Esses dois reguladores de crescimento de plantas vêm sendo utilizados com muita eficiência na indução de brotos adventícios de bromélias cultivadas *in vitro* (MERCIER & KERBAUY, 1997), e em conjunto com os sais de MS perfazem uma boa ferramenta para a multiplicação *in vitro* desta família.

Os brotos gerados nesta fase de cultivo apresentaram praticamente 100% de aproveitamento no ato de sua utilização para os experimentos de micropropagação massal, o que confirma a efetividade do meio de cultura (MS) e fitorreguladores utilizados (ANA, BAP), principalmente na obtenção de explantes padrões para a elaboração de experimentos.

4.2. Consolidação de um protocolo regenerativo para *V. fosteriana*

4.2.1. Multiplicação das culturas

Aos 120 dias da inoculação das culturas, quando o experimento foi avaliado, observou-se uma maior taxa proliferativa (14,45 brotos/explante) em meio de cultura MS suplementado com 6 μ M de PBZ, sendo que a suplementação com 4 μ M de PBZ não diferiu estatisticamente quanto a taxa proliferativa (14,33 brotos/explante) das culturas. Todos os demais tratamentos, com suplementações superiores e inferiores de PBZ, apresentaram taxas proliferativas menores (SNK, 95%) em relação aos tratamentos supracitados (Tabela 1).

MERCIER & KERBAUY (1992) observaram a formação de protuberâncias (massas celulares) em culturas *in vitro* de *V. fosteriana*. No isolamento e multiplicação destas culturas obtiveram taxas de multiplicação na ordem de 22,5 brotos/explante após três meses de cultivo em meio de cultura suplementado com ANA e BAP.

Tabela 1. Efeito do PBZ na proliferação e freqüência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm, no cultivo *in vitro* de *V. fosteriana*.

PBZ (μM)	Proliferação (brotos/explante)	Freqüência (%) 0-1,5 cm
0	5,33c	76,16b
2	10,42b	95,98a
4	14,33a	95,63a
6	14,46a	97,60a
8	9,78b	95,12a
CV:	5,95%	2,85%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Em *Dickia distachia*, uma bromélia em extinção do Sul do Brasil, a indução de calos foi observada quando peças da haste floral foram inoculadas em meios de cultura suplementados com diferentes tipos e níveis de auxinas (DAQUINTA *et al.*, 1998). Entretanto, estudos desenvolvidos por POMPELLI (2002), resultaram em um grande avanço na micropropagação desta espécie, a partir de explantes obtidos de sementes. Este autor observou que a suplementação de ANA, BAP e PBZ ao meio MS líquido resultou nas mais altas taxas de multiplicação de brotos (133,6 brotos/explantes), quando comparados com o uso de meio de cultura geleificado (72,9 brotos/explantes).

O PBZ foi efetivo para a multiplicação *in vitro* de *V. fosteriana* e, particularmente a concentração de 4 μM parece ser a mais adequada para a propagação desta espécie, já que outros experimentos mostraram que níveis mais altos tendiam a promover efeitos fitotóxicos nos explantes. Uma regressão polinomial de segunda ordem (Figura 1) demonstrou esta tendência do comportamento da espécie frente as diferentes concentrações de PBZ, onde é possível observar que até os níveis entre 4 e 6 μM a taxa proliferativa aumentou, e após isso diminuiu novamente.

A avaliação da distribuição dos brotos gerados nas diferentes classes de altura (Tabela 1), novamente revelou a efetividade do PBZ em inibir a síntese de giberelina e promover uma maior multiplicação das culturas através da indução da brotação de gemas axilares. Observou-se que nos tratamentos suplementados com PBZ a freqüência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm foi acima de 95%, maior (SNK, 95%) do que a freqüência obtida em meio de cultura isento deste fitorregulador (76,16 %). Dentro desta classe de altura foram obtidos 60% de explantes aptos a submissão a técnica de unidades encapsuláveis (0,5 a 1,0 cm), fato que ditou a quantidade de repetições e unidades amostrais para o seguimento dos experimentos.

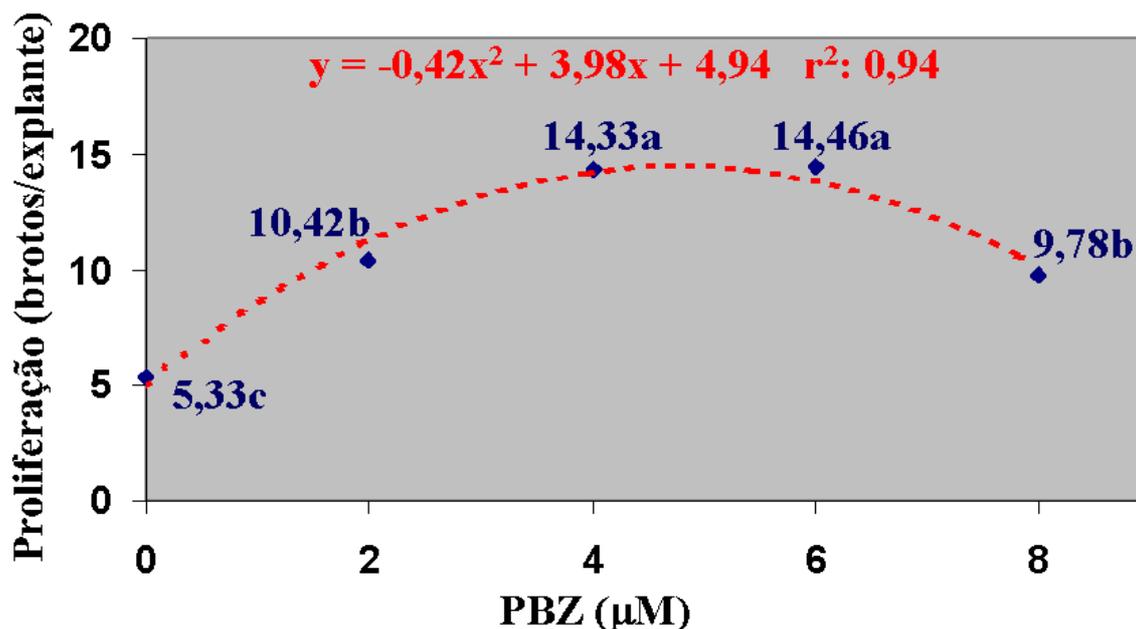


Figura 1. Efeito do PBZ na proliferação de brotos *in vitro* de *V. fosteriana* aos 120 dias de cultivo no sistema convencional em meio de cultura MS.

4.2.1. Estabelecimento *ex vitro* através de unidades encapsuláveis

O tempo de descomplexação em KNO_3 não foi suficiente para o rompimento das cápsulas. Isto facilitou o transplante das unidades encapsuláveis nas bandejas com vermiculita.

Aos 12 dias da implantação do experimento observou-se o início do rompimento das cápsulas. Na ocasião da avaliação de sobrevivência, onde foi verificada a porcentagem de plantas efetivamente estabelecidas via unidades encapsuláveis observou-se uma maior viabilidade média (86,13% de sobrevivência) em brotos provenientes da micropropagação em meio de cultura MS suplementado com PBZ (4 μM), pré-induzidas em meio de cultura MS suplementado com AG_3 (5 μM), encapsuladas em matriz de alginato de sódio 2% (Tabela 2 – Figura 3).

Tabela 2. Efeito do PBZ, AG_3 e alginato de sódio na porcentagem de sobrevivência das unidades encapsuláveis aos 45 dias em fitotron.

PBZ (μM)	AG_3 (μM)	Alginato de Sódio		PBZ	AG_3	Outras Interações Significativas			
		1%	2%			PBZ: AG_3		PBZ:Alginato	
0	0	8,33c	11,10c	9,71B	24,99B	0:0	9,71c	0:1	6,94c
	5	5,55c	13,88c		39,59A	0:5	9,71c	0:2	12,49c
4	0	24,98c	55,58b	54,87A		4:0	40,28b	4:1	38,89b
	5	52,80b	86,13a			4:5	69,46a	4:2	70,85a
Alginato		22,91b	41,67a	CV: 27,32					

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Culturas geradas em meio de cultura MS suplementado com PBZ (4 μM) mostraram-se mais aptas ao processo de estabelecimento *ex vitro* através de unidades encapsuláveis. O PBZ proporcionou uma melhor (SNK, 95%) sobrevivência (54,87%) em relação a culturas não suplementadas (9,71%).

Plantas cultivadas *in vitro* são altamente susceptíveis a dessecação quando submetidas ao processo de transferência a campo, ou seja, a aclimatização. A sobrevivência das plantas depende de sua habilidade para alcançar a fotossíntese e resistir a perda de água. PANAIÁ *et al.*, (2000) em seu trabalho com *Symonanthus bancroftii* observaram que meio suplementado com 10,2 μM de PBZ aumentou a sobrevivência (90%) quando comparado a tratamentos controles que apresentaram apenas 50% de sobrevivência. Neste mesmo trabalho verificaram que o PBZ proporcionou um maior número de raízes por broto, além de um significativo aumento na resposta ao enraizamento.

O AG₃, a exemplo do PBZ, também foi efetivo no estabelecimento das unidades encapsuláveis. A indução das culturas em meio MS suplementado com 5 μM deste fitorregulador promoveu um aumento de 58,4 % na taxa de sobrevivência (Tabela 2). Além disso, observou-se aos 60 dias da transferência das culturas para casa de vegetação, que o AG₃ promoveu um incremento de 22 % na formação de folhas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do AG₃ no incremento médio de folhas de plântulas de *V. fosteriana* estabelecidas *ex vitro* através de unidades encapsuláveis. Culturas aos 60 dias em casa de vegetação.

AG ₃ (μM)	INCREMENTO FOLHAS
0	3,89B
5	4,76A

CV: 6,92%

OBS: Letras diferentes indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Na micropropagação de cana-de-açúcar, a utilização de 1,0 mg.L^{-1} (3,4 μM) de PBZ aumentou significativamente (2,4 vezes) a taxa de multiplicação das culturas. A adição de 1,0 mg.L^{-1} de AG₃ em sub-cultivo subsequente, aumentou o crescimento em altura dos brotos em 3,4 vezes (LORENZO *et al.*, 1998).

Feuser *et al.*, (2001) observaram que apesar do PBZ aumentar a taxa de multiplicação do abacaxizeiro foi necessário adicionar-se AG₃ ao meio de cultura para estimular o alongamento das brotações.

Em meio de cultura contendo AG₃ (2,9 μM), embriões somáticos de manga originários de explantes nucelares encapsulados numa matriz de alginato (2%), germinaram com sucesso (ARA *et al.*, 1999). Em sementes sintéticas de mamão a frequência da regeneração de

embriões somáticos foi significativamente afetada pela concentração de alginato de sódio, a presença de sais nutritivos na cápsula, bem como na duração do tempo de exposição ao cloreto de cálcio. Cápsulas constituídas numa matriz com 2,5% de alginato de sódio e metade dos sais de MS, complexadas durante 10 minutos em solução de cloreto de cálcio, apresentaram boa uniformidade. Nestas condições foi obtida uma boa frequência de germinação (77,5%) dos embriões, que produziram plantas normais (CASTILLO *et al.*, 1998).

Interações específicas entre os fatores PBZ e AG₃ (Tabela 2) demonstram que de fato a conjugação destes fitorreguladores favoreceu a germinação das unidades encapsuláveis. Além disso, a união do PBZ com 2% de alginato também foi determinante para o sucesso do processo (Tabela 2).

Plantas obtidas foram estabelecidas com sucesso na coleção de germoplasma do LFDGV/CCA/UFSC. No presente trabalho, foi estabelecido um protocolo (Figura 2) para multiplicação e estabelecimento *ex vitro* via unidades encapsuláveis para *V. fosteriana*. Trabalhos futuros poderão aperfeiçoá-lo, principalmente no que tange ao aumento da taxa proliferativa das culturas. A conjugação com a tecnologia dos BIT pode ser fundamental na otimização do processo.

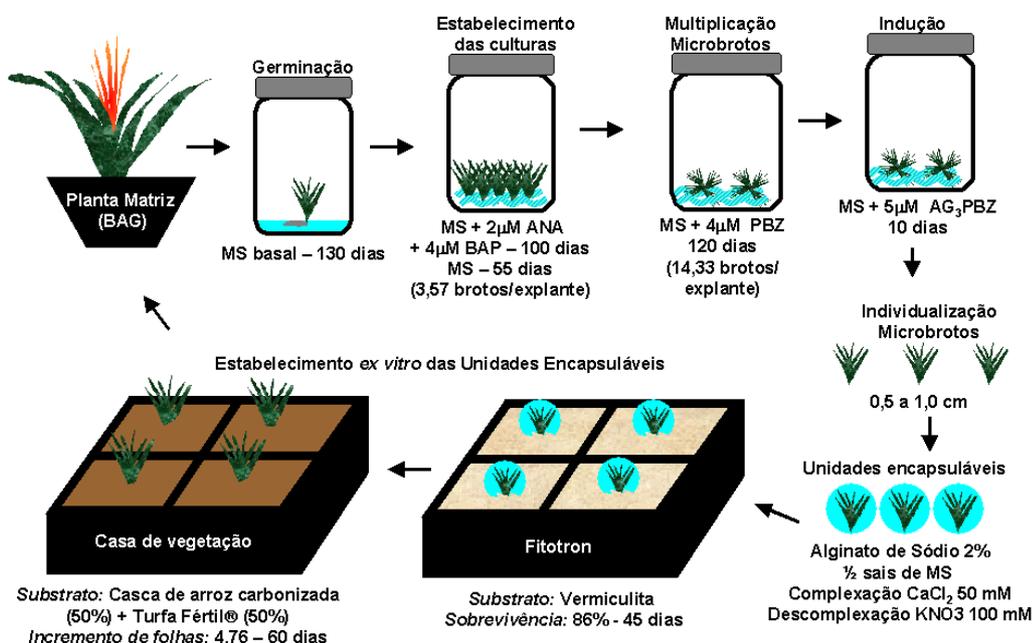


Figura 2. Protocolo regenerativo para *V. fosteriana*. Rota de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e estabelecimento *ex vitro* via unidades encapsuláveis.

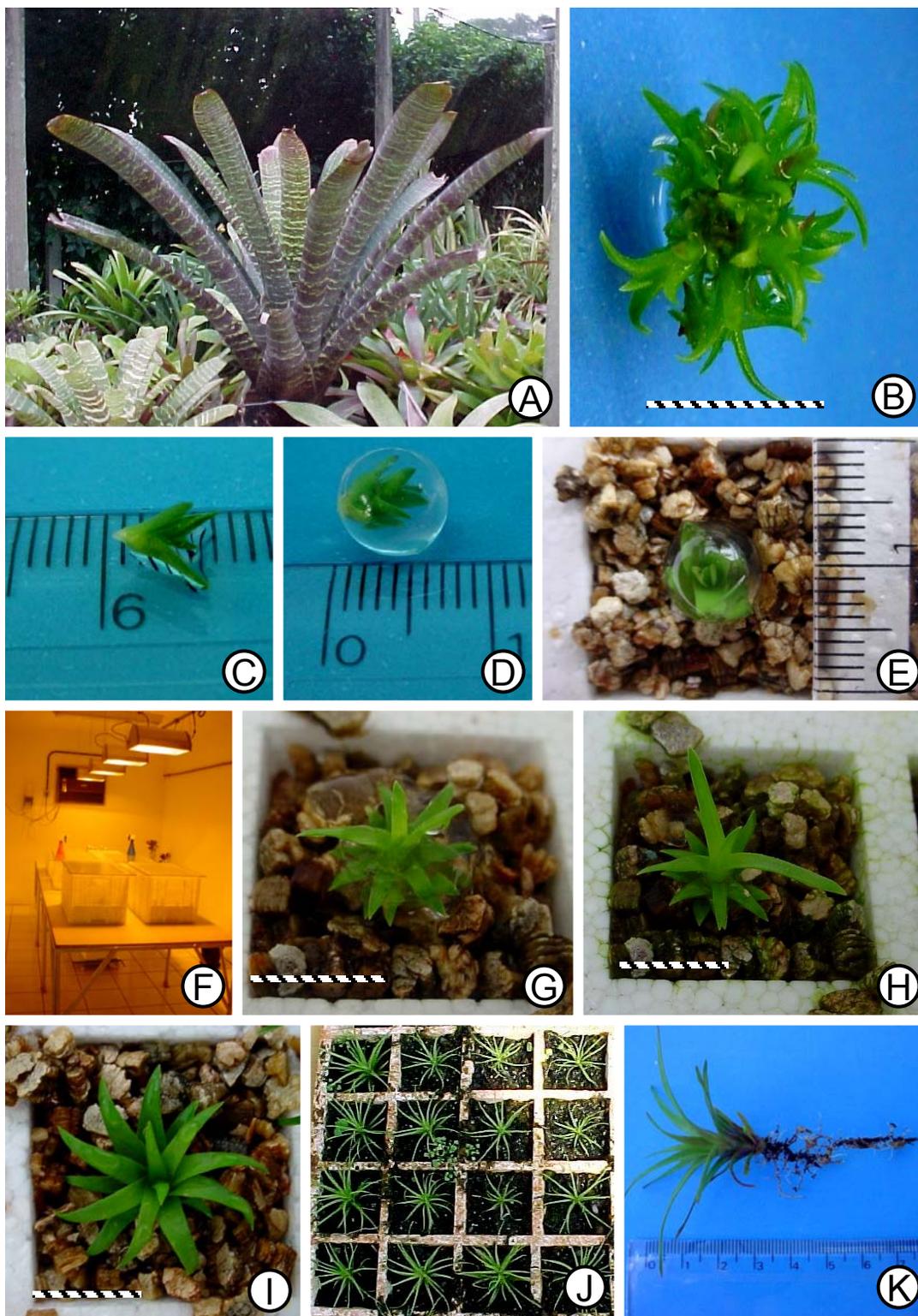


Figura 3. Unidades encapsuláveis de *V. fosteriana*. **A.** Planta matriz. **B.** Microbrotos aos 120 dias em meio de cultura MS suplementado com 4 μM de PBZ. **C.** Microbroto individualizado após B + 10 dias de indução em meio de cultura MS suplementado com 4 μM de AG_3 . **D.** Microbroto C encapsulado em matriz de alginato de sódio 2% adicionada dos sais de $\text{MS}^{1/2}$. **E.** Transplante da unidade encapsulável D em substrato vermiculita no **F.** fitotron. **G, H e I.** Estabelecimento das unidades encapsuláveis D respectivamente aos 15, 24 e 45 dias de cultivo em vermiculita. **J e H.** Respectivamente aos 30 e 60 dias de cultivo em substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fértil® (50%) na casa de vegetação. Bar.: 1cm.

4.3. Consolidação de um protocolo regenerativo para *V. gigantea*

4.3.1. Multiplicação das culturas

A avaliação da taxa proliferativa das culturas aos 100 dias de cultivo revelou como maior potencial para proliferação da espécie *V. gigantea* o tratamento composto por meio de cultura MS suplementado com 4 μM de PBZ. Este meio de cultura proporcionou uma proliferação média de 21,25 brotos/explante valor este superior (SNK, 95%) aos valores obtidos em resposta a todos os demais tratamentos (Tabela 4 – Figura 6).

Tabela 4. Efeito do ANA, BAP e PBZ na proliferação (brotos/explante) *in vitro* de *V. gigantea* aos 100 dias de cultivo em meio de cultura MS.

ANA/BAP (μM)	PBZ (μM)				ANA/BAP
	0	2	4	6	
0/0	2,33e	15,50c	21,25a	18,00b	13,77A
2/4	8,50d	12,08c	18,83b	17,75b	14,29A
PBZ	5,47c	12,79b	20,04a	17,88a	CV: 15,63%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Novamente, a exemplo de todos os experimentos realizados no presente trabalho, o PBZ mostrou-se efetivo no aumento da taxa proliferativa das culturas, promovendo um incremento significativo, principalmente na suplementação de 4 μM . Observou-se um aumento da taxa proliferativa até a suplementação de 4 μM , decaindo a seguir. Uma regressão polinomial de segunda ordem (Figura 4) confirma o comportamento da proliferação frente as diferentes concentrações de PBZ em *V. gigantea*, resultado semelhante ao observado nas outras espécies do trabalho.

RECH FILHO *et al.* (2003b) observaram que aos 100 dias de cultivo a maior taxa média de proliferação (20,3 brotos/explante) de *V. gigantea* ocorreu em resposta ao meio de cultura MS suplementado com PBZ (4 μM), sem, contudo, revelar diferenças estatísticas das respostas obtidas com o meio de cultura suplementado com PBZ (6 μM) e com ANA (2 μM), BAP (4 μM) e PBZ (4 μM). Já aos 170 dias, observou-se que culturas provenientes da primeira fase em meio de cultura MS, suplementado com ANA (2 μM), BAP (4 μM) e PBZ (2, 4 ou 6 μM) e sub-cultivadas para meio de cultura MS, isento de fitorreguladores, resultaram em uma taxa média de proliferação de 2,1 brotos/explante, configurando um efeito residual destes reguladores. Estes autores observaram que o PBZ pode induzir a formação de aglomerados de gemas, inibindo a dominância de microbrotos e aumentando a taxa proliferativa em sistemas de cultivo *in vitro*.

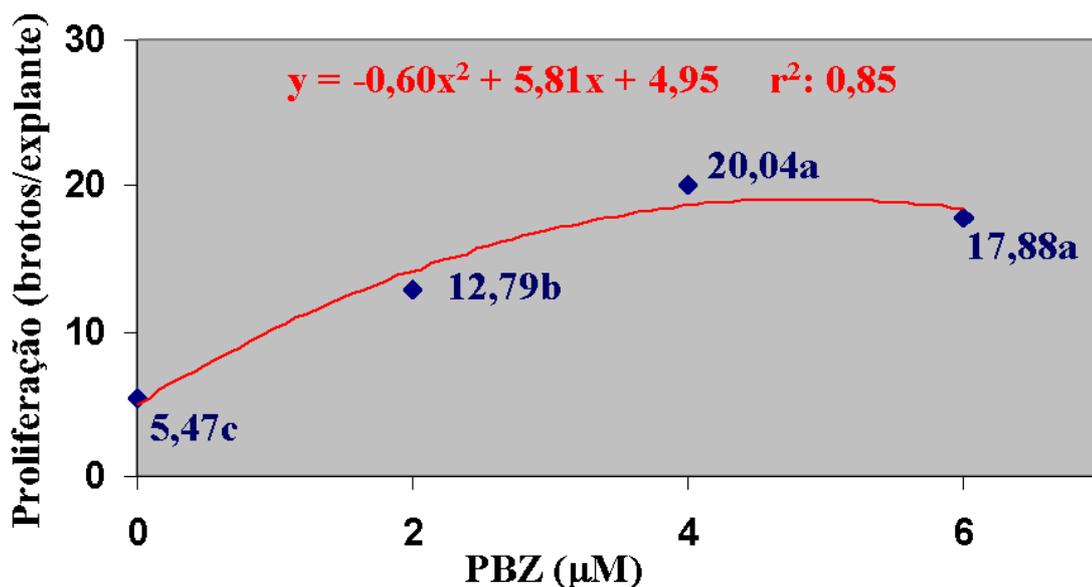


Figura 4. Efeito do PBZ na proliferação *in vitro* de *V. gigantea*.

De maneira geral a suplementação de ANA e BAP ao meio de cultura MS não foi significativa para o aumento da taxa proliferativa das culturas (Tabela 4). Entretanto, na interação dos dados foi possível observar um favorecimento da proliferação e frequência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm em culturas oriundas apenas da suplementação destes dois fitorreguladores sem PBZ, frente ao tratamento com meio de cultura isento (Tabela 5). Isto demonstra que estes dois fitorreguladores podem ter efeito positivo no incremento da taxa proliferativa em meios não suplementados com PBZ. Em conjunto com os sais de MS, esses dois reguladores de crescimento de plantas vêm sendo utilizados com muita eficiência na indução de brotos adventícios de bromélias cultivadas *in vitro* (MERCIER & KERBAUY, 1997).

A avaliação de distribuição dos brotos em diferentes classes de altura mostrou que o PBZ promove uma diminuição na altura dos microbrotos gerados, já que em função de sua gradativa suplementação ao meio de cultura MS promoveu um incremento linear na frequência de brotos na classe de altura de 0 a 1,5 cm (Tabela 5). Além disso, 60% dos brotos desta classe de altura apresentavam-se em condições encapsulamento nos tratamentos com a suplementação de 4 μM de PBZ (Figura 6).

Tabela 5. Efeito do ANA, BAP e PBZ na frequência de brotos (%) na classe de 0 a 1,50 cm, no cultivo *in vitro* de *V. gigantea*, em meio de cultura MS.

ANA/BAP (μ M)	PBZ (μ M)				ANA/BAP
	0	2	4	6	
0/0	46,63b	71,93a	75,65a	87,57a	70,44A
2/4	77,23a	75,74a	79,20a	82,75a	78,73A
PBZ	<i>61,93b</i>	<i>73,82ab</i>	<i>77,42a</i>	<i>85,16a</i>	CV: 16,58%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

4.3.2. Estabelecimento *ex vitro* através de unidades encapsuláveis

Na avaliação viabilidade das culturas estabelecidas *ex vitro* através de unidades encapsuláveis, observou-se aos 50 dias uma maior taxa de sobrevivência (85%) nas culturas oriundas de meio de cultura MS suplementado com 4 μ M de PBZ, ou então MS suplementado com 2 μ M de ANA + 4 μ M de BAP + 4 μ M de PBZ, que apresentou a mesma taxa de sobrevivência. Ambos os tratamentos foram encapsulados em matriz de alginato sem a presença de carvão ativo (Tabela 6 – Figura 6).

Tabela 6. Efeito do ANA, BAP, PBZ e do carvão ativo, na taxa de sobrevivência (%) das unidades encapsuláveis de *V. gigantea*.

ANA/BAP (μ M)	PBZ (μ M)	Carvão Ativo (%)		ANA/BAP	PBZ	Outras Interações significativas					
		0	1			ANA/BAP:PBZ	ANA/BAP:CA	PBZ:CA			
0/0	0	25bc	10c	46B	29b	0/0:0	18c	0/0:1	38b	0:1	25c
	4	85a	65a		76a	0/0:4	75a	0/0:0	55a	0:0	33c
2/4	0	40b	40b	59A		2/4:0	40b	2/4:1	55a	4:1	68b
	4	85a	70a			2/4:4	78a	2/4:0	63a	4:0	85a
Carvão Ativo		59a	46b			CV: 22,86%					

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

A exemplo do experimento com *V. fosteriana*, o PBZ mostrou-se efetivo no incremento da taxa de sobrevivência das culturas. Sua suplementação ao nível de 4 μ M promoveu uma taxa média de 76% de sobrevivência, frente a 29% em culturas não suplementadas (Tabela 6 – Figura 5).

Na última década, alguns trabalhos vêm relatando os efeitos benéficos do PBZ, em relação a melhor habilidade das planta no estabelecimento *ex vitro*. Estes efeitos estão relacionados com uma melhora na resistência à dessecação e atribuídos a: a) uma redução na relação peso fresco/seco dos brotos; b) um incremento na cerosidade por unidade de área foliar; c) um melhoramento na habilidade do fechamento dos estômatos em resposta ao estresse hídrico; d) encurtamento e engrossamento das raízes (ROBERTS & MATTHEWS, 1995; PODWYSZYNSKA, 1997).

Os fitorreguladores ANA e BAP também se mostraram efetivos no incremento da taxa de sobrevivência aos 50 dias do estabelecimento *ex vitro* das unidades encapsuláveis. Culturas induzidas em meio composto por estes fitorreguladores apresentaram sobrevivência média de 59%, significativamente superior (SNK, 95%) a culturas não induzidas que apresentaram 46% de sobrevivência (Tabela 6). Além disso, estes dois fitorreguladores promoveram melhor formação de folhas na segunda fase (em casa de vegetação dos 50 aos 125 dias) do estabelecimento *ex vitro*, aumentando em 1,5 vezes o número de folhas por planta (Tabela 7).

A presença do carvão ativo a matriz de encapsulamento não se mostrou efetiva, diminuindo de 59% para 46% a taxa de sobrevivência das culturas (Tabela 6). Entretanto, a adição de 1% desta substância mostrou-se efetiva na segunda fase do processo de estabelecimento *ex vitro*, incrementando de 4,54 para 4,96 o número de folhas por planta (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do ANA, BAP e PBZ, e do carvão ativo no incremento médio de folhas no processo de estabelecimento *ex vitro* de unidades encapsuláveis de *V.gigantea*.

ANA/BAP/PBZ (μ M)	Carvão Ativo (%)		ANA/BAP/PBZ
	0	1	
0/0/4	3,25b	4,42a	3,83B
2/4/4	5,83a	5,50a	5,67A
Carvão Ativo	4,54b	4,96a	CV: 15,2%

OBS: Letras diferentes com o mesmo caractere indicam a diferença estatística (SNK, 95%) entre as médias.

Estudos demonstram que a adição de carvão ativo a matriz de alginato promove um incremento na respiração dos embriões somáticos, além de reter aglomerados de nutrientes, os quais são gradativamente liberados para o explante, favorecendo assim o estabelecimento das culturas (SAIPRASAD, 2001). O seu comportamento nas unidades encapsuláveis de *V.gigantea* parece ter sido semelhante, já que apesar de diminuir a sobrevivência na fase inicial de estabelecimento, foi um fator promotor do incremento foliar na fase seguinte. Contudo, as diferenças foram mais significativas quanto a taxa de sobrevivência, tornando assim dispensável a utilização deste composto na matriz de alginato.

Plantas obtidas foram estabelecidas com sucesso na coleção de germoplasma do LFDGV/CCA/UFSC. O trabalho revelou uma rota (Figura 5) de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e estabelecimento *ex vitro* via unidades encapsuláveis como um protocolo efetivo na obtenção de plantas saudáveis de *V.gigantea*. Assim como em *V.fosteriana*, a conjugação com a tecnologia dos BIT poderá incrementar a taxa de multiplicação das culturas, otimizando o processo.

Nos dois protocolos obtidos por intermédio da tecnologia de unidades encapsuláveis, eliminou-se uma fase de cultivo dentro do laboratório, a fase de crescimento dos brotos e preparo para aclimatização. Além disso, no sistema convencional de micropropagação, somente após esta fase as culturas iriam iniciar o processo de aclimatização. Portanto, as características de baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, além da possibilidade do estabelecimento dos propágulos direto a campo num estágio mais precoce do que em sistemas convencionais de propagação (SAIPRASAD, 2001) foi confirmada.

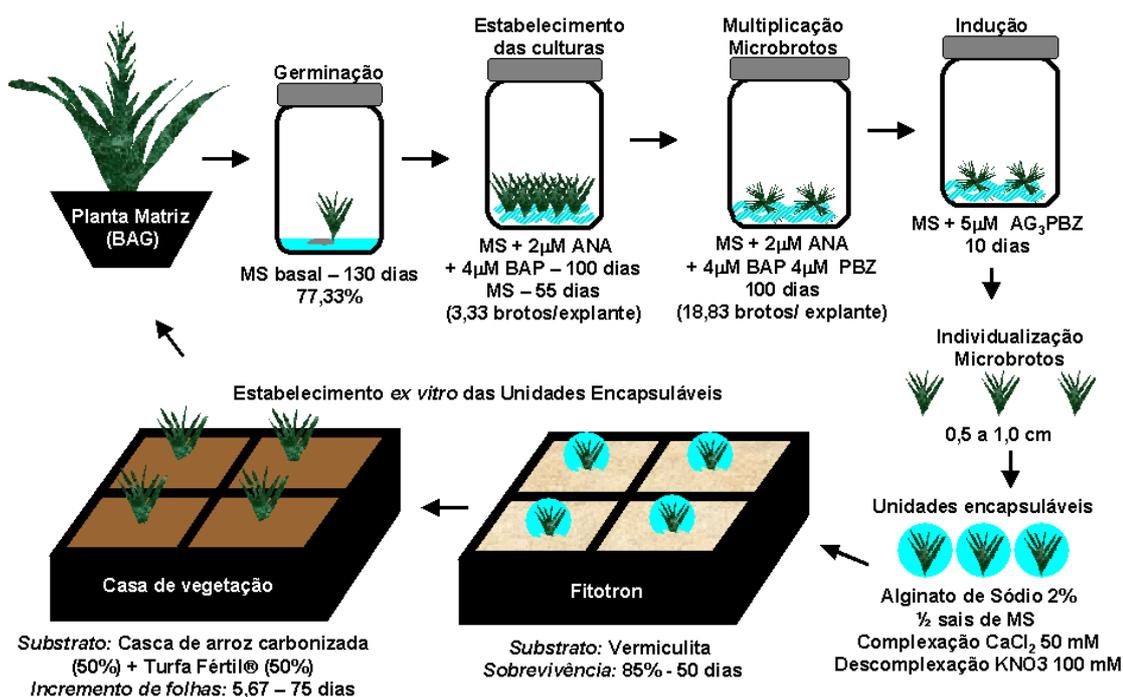


Figura 5. Protocolo regenerativo para *V. gigantea* Rota de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e estabelecimento *ex vitro* via unidades encapsuláveis.



Figura 6. Unidades encapsuláveis de *V. gigantea*. **A.** Planta matriz. **B.** Microbrotos aos 100 dias em meio de cultura MS suplementado com 2 μM ANA + 4 μM BAP + 4 μM de PBZ. **C.** Microbrotos individualizados após B + 10 dias de indução em meio de cultura MS suplementado com 4 μM de AG_3 . **D.** Microbrotos C encapsulados em matriz de alginato de sódio 2% adicionada de $\frac{1}{2}$ dos sais de MS. **E.** Transplante das unidades encapsuláveis D em substrato vermiculita nas bandejas de isopor acondicionadas em **F.** caixas plásticas com tampa de vidro. **G e H.** Estabelecimento das unidades encapsuláveis D respectivamente aos 12 e 25 dias de cultivo em vermiculita. **I.** Aos 75 dias de cultivo em substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fértil® (50%) na casa de vegetação. **J.** I + 100 dias na coleção de germoplasma. Bar.: 1cm.

5. CONCLUSÕES

- a) O fitorregulador PBZ é uma importante ferramenta para a multiplicação *in vitro* de *V. fosteriana* e *V. gigantea*, promovendo boas taxas proliferativas e permitindo a obtenção de microbrotos para o encapsulamento em hidrogel;
- b) Em conjunto com o AG₃, o PBZ favorece o estabelecimento *ex vitro* de unidades encapsuláveis de bromélias;
- c) O PBZ, ANA e BAP são efetivos no incremento do número de folhas nas plântulas estabelecidas *ex vitro* via unidades encapsuláveis;
- d) A tecnologia de unidades encapsuláveis consolida-se como ferramenta fundamental para o estabelecimento de propágulos direto a campo, em estágios mais precoces do que em sistemas convencionais de propagação, permitindo uma melhor otimização dos protocolos de micropapagação por possibilitar a eliminação de estágios da cultura *in vitro*, em favor do crescimento *ex vitro*. Uma redução nos custos de produção poderá ser uma decorrência destas melhorias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARA, A.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). **Plant Cell Reports**, v. 19, p.166–170, 1999.
- CANGAHUALA INOCENTE, G.C. **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas em *Feijoa sellowiana* Berg.: Sistema Referência e aspectos morfo-histológicos e bioquímicos**. Dissertação. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais / CCA / UFSC) Florianópolis, SC, 137p., 2002.
- CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.; YADAVA, U.L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, v.17, p.172-176, 1998.
- CHEN, D.F.; CHEN, X.W.; LI, Z.D. Germination and storage characteristics of ramie artificial seeds made of adventitious buds. **China's Fibre Crops**, v.2, p.1-5, 1996.
- CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. **Indian J. Exp. Biol.**, v.31, p.61-64, 1993.
- DAQUINTA, M.; ALMEIDA, A.P.; GUERRA, M.P. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 49, p.72-76, 1998.
- DUPUIS, J. M. Pharmaceutical capsules as a coating system for artificial seeds. **Bio-Technology**, v. 12, n. 4, p.385-389, 1994.
- FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência Comparativa dos Sistemas de Cultura Estacionária e Imersão Temporária para a Micropropagação do Abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.006-010, 2001.
- GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A.; RAO, P.S. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. **Plant Cell Reports**, v.11, p.571-575, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v.1, p.183-260, 1998.
- GRAY, D.J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.10 p.33–61, 1991.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.117–128, 2001.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.2, p.533–568, 1998.
- LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.C.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.79-83, 1998.
- MAMIYA, K.; SAKAMOTO, Y. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.27–32, 2001.

- MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R. S.; REVILLA, M. A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v.19, p.59–63, 1999.
- MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germoplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Reports**, v.16, p.393-396, 1997.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.30, p.247-249, 1992.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, v.1, p.70-72, 1993.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajai, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin:Springer-Verlag. v.40, p.43-57, 1997.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; WILLIAMS, E.G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S.S. **Plant Tissue Culture: applications and limitations, Developments in crops science 19**, Amsterdam, Elsevier, p.67–101, 1995.
- MOREL, G.M. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v.29, p.495-497, 1960.
- MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. **Am.J.Bot.**, n.38, p.141-143, 1951.
- NAKASHIMADA, Y.; UOZUMI, N.; KOBAYASHI, T. Production of plantlets for use as artificial seeds from horseradish hairy roots fragmented in a blender. **J. Ferment Bioeng**, v.79, p.458-464, 1995.
- NIEVES, N.; LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ, J.; PERALTA, H.; HERNÁNDEZ, M.; SANTOS, R.; CONCEPCIÓN, O.; BORROTO, C.G.; BORROTO, E.; TAPIA, R.; MARTINEZ, M.E.; FUNDORA, Z.; GONZÁLEZ, A. Artificial endosperm of *Cleopatra* tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.77–83, 1998.
- NIEVES, N.; MARTINEZ, M.E.; CASTILLO, R.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.L. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.15-21, 2001.
- ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p. 137–145, 1994.
- PANAIA, M.; SENARATNA, T.; BUNN, E. DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F.Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.23-29, 2000.
- PATEL, A.V.; PUSCH, I.; MIX-WAGNER, G.; VORLOP, K.D. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**. v. 19, p.868–874, 2000.
- PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Morphogenic responses of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.177-185, 2000.

PATTNAIK, S.K.; CHAND, P.K. Artificial seeds as an aid to clone white mulberry. In: V International Workshop on Bioencapsulation, Potsdam, Germany, **Abstracts...**, p.165-168, 1996.

PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Cryopreservation of apple (*Malus domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p.768-774, 2000.

PICCIONI, E. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.47, p.225-260, 1997.

PICCIONI, E.; GASBARRO, E.; STANDARDI, A. Indagine preliminare sull'incapsulamento di propaguli di *Lilium* e di M.27 vitro-derivati. **Ann Fac Agrar Univ Stud Perugia**, v.46, p.357-371, 1992.

PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Encapsulation of micropropagated buds of six wood species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.221-226, 1995.

PODWYSZYNSKA, M. Micropropagation of *Calathea ornata* Koern. **Biologia Plantarum**, v.39, n.2, p.79-186, 1997.

POMPELLI, M.F. **Morfogênese in vitro, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler**, Florianópolis, SC, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, CCB/UFSC), 93p., 2002.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; MÜLLER, C.V.; ALVES, G.M.; CUNHA, L.; GUERRA, M.P. Efeitos do Paclobutrazol na morfogênese *in vitro* de *Vriesea gigantea*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v15 (Suplemento, IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal), p.154, 2003b.

ROBERTS, A.; MATTHEWS, D. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil: 5. The 2S, 3S enantiomer of paclobutrazol improves resistance to desiccation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, p.191-193, 1995.

SAIPRASAD, G.V.S. Artificial seeds and their applications. **Resonance**, May, p.39-47, 2001.

SAKAMOTO, Y.; ONISHI, N.; HIROSAWA, T. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: Fennz, A.; Toyoki, C.; Schmit, M. A. **Automation and environmental control in plant tissue culture**, Kluwer Academics Publishers, Dordrecht Boston London, p.215-241, 1995.

SANDÓVAL-YUGAR, E.W. **Elucidación dos pontos de controle da morfogênese e otimização de protocolos regenerativos in vitro de *Musa sp.* Cv. Grand Naine**, Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC), 115p., 2002.

SMITH, E.F.; ROBERTS, A.V.; MOTTLEY, J. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil: 2. Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.133-140, 1991.

SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) **Plant Cell Reports**, v.20, p.891-894, 2002.

STANDARDI, A.; MICHELI, M.; PICCIONI, E. Incapsulamento in alginato di espianti micropropagati. **Italus Hortus**, v.2, p.46-52, 1995.

STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants. **Int. J. Plant Sci.**, v.159, n.6, p.968-978, 1998.

STANDARDI, A.; PICCIONI, E.; LUZI, L.; ROIG, C. Indagine sulla attitudine all'incapsulamento di propaguli vitro-derivati di diversi specie. In: Giornate Scientifiche Società Orticola Italiana, S. Bento del Tronto, **Proceedings...**, p.137-138, 1994.

STINGH, F. Encapsulation of *Spathoglottis plicata* protocorms. **Lindleyana**, v.6, p.61-63, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram como importantes ferramentas na micropropagação de bromélias as tecnologias de biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis. A elas associado, o PBZ consolidou-se como fator importante na promoção de multiplicação massal de brotos e estabelecimento precoce *ex vitro* de propágulos micropropagados.

Os resultados obtidos revelam parâmetros para a aplicabilidade de protocolos visando a produção massal de bromélias ornamentais com fins comerciais e/ou para a recuperação de bromélias ameaçadas de extinção.

As concentrações de PBZ e tempos de sub-cultivo no sistema de BIT parecem ser peculiaridades de cada espécie. Apesar disso, os resultados obtidos servem como parâmetro importante para estabelecimento de novos avanços nesta área.

Uma peculiaridade do trabalho foi a correlação negativa entre a capacidade proliferativa das culturas e aumento nos níveis de fenóis presentes no meio de cultura ao longo dos sub-cultivos. Aprofundar este aspecto associado ao metabolismo das culturas poderá ser uma ferramenta de elucidação do comportamento regenerativo das culturas.

A tecnologia de unidades encapsuláveis possibilitou o estabelecimento *ex vitro* dos propágulos em estágios mais precoces quando comparado a micropropagação convencional, reduzindo custos e aumentando a eficácia do sistema de produção em larga escala. Contudo a textura e composição da cápsula poderá ser alvo de refinamento em trabalhos futuros.

Assim, o presente trabalho adicionou novos e importantes elementos para a micropropagação massal de bromélias, possibilitando a aplicação de protocolos em nível comercial e contribuindo para o avanço tecnológico nesta área da biotecnologia, oportunizando a produção massal de propágulos, com conseqüentemente diminuição da ação indiscriminada de extração destas espécies na Floresta e permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos em híbridos e espécies de alto valor ornamental.