

# OTIMIZAÇÃO DA MICROPROPAGAÇÃO DE *VRIESEA GIGANTEA* GAUDICH. (BROMELIACEAE), UMA ESPÉCIE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO, NATIVA DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

Marta Bencke<sup>1</sup>  
Annette Droste<sup>2</sup>

## Abstract

Bromeliads are an important component in the maintenance of biodiversity in the Atlantic Forest, due to their peculiar structural and functional characteristics. Many species show a high ornamental and commercial value, turning them specially vulnerable to extractivism, like *Vriesea gigantea* Gaudich.. Tissue culture has been employed for the mass propagation and conservation of bromeliads threatened of extinction. The present work describes an efficient protocol for plant production of *V. gigantea*. Seedlings were cultured on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA). Seed germination percentage was of 100%. Induction and proliferation of adventitious shoots were observed in the two tested combinations of growth regulators. MS medium with BAP (0.5 mg/l) and NAA (0.1 mg/l) permitted the major proliferation rate (20 shoots/plantlet). After eight months in culture medium with plant regulators, the multiplication rate of adventitious shoots was two to three times higher when compared with the rate obtained after six months, indicating that the maintenance of plantlets in culture for a longer time is necessary for the induction of multiple shoots. All plantlets with at least 1.5 cm were successfully acclimated ex vitro.

**Key words:** Bromeliad, in vitro culture, micropropagation.

## Resumo

As bromélias são importantes componentes para a manutenção da biodiversidade do bioma Mata Atlântica, devido a suas características estruturais e funcionais peculiares. Muitas espécies apresentam alto valor ornamental e comercial, o que as torna especialmente vulneráveis ao extrativismo, como *Vriesea gigantea* Gaudich.. A cultura de tecidos tem sido

---

<sup>1</sup>Bióloga, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, CP 275, CEP 93022-000, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: mbencke@gmail.com

<sup>2</sup> Doutora, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Avenida Unisinos 950, 93022-000 São Leopoldo, RS, Brasil / Centro Universitário FEEVALE, RS-239 2755, 93352-000 Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: adroste@unisinos.br

empregada para a propagação massal e conservação de bromélias ameaçadas de extinção. O presente trabalho descreve um protocolo eficiente para a produção de plantas de *V. gigantea*. Plântulas providas de sementes foram cultivadas no meio Murashige & Skoog (MS) suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA). A porcentagem de germinação das sementes foi de 100%. Indução e proliferação de brotos adventícios ocorreram nas duas combinações de reguladores vegetais testadas. O meio MS com BAP (0,5 mg/l) e NAA (0,1 mg/l) permitiu a maior taxa de proliferação (20 brotos/plântula). Após oito meses em meio de cultura com reguladores vegetais, a taxa de multiplicação de brotos adventícios foi duas a três vezes maior, quando comparada com a taxa obtida após seis meses, o que indicou ser necessária a permanência das plântulas em cultura por um tempo maior, para a indução de múltiplos brotos. Todas as plântulas com pelo menos 1,5 cm foram aclimatizadas ex vitro com sucesso.

**Palavras-chave:** Bromélia, cultura in vitro, micropropagação.

## Introdução

A crescente diminuição da cobertura vegetal da Mata Atlântica vem causando a diminuição da biodiversidade e a conseqüente perda de patrimônio genético, afetando também a flora epifítica, originalmente rica em espécies da família Bromeliaceae (Coffani-Nunes, 2002). A complexidade estrutural das bromélias cria condições para a coexistência de outras formas de vida, pois permite o armazenamento de água, proporcionando diferentes microhabitats para espécies animais e vegetais. Além disso, a família Bromeliaceae apresenta uma importante variedade de formas e recursos florais, o que atrai um grande número de polinizadores, tanto vertebrados quanto invertebrados, além de servir como sítio de obtenção de recursos por ácaros florais (Rocha *et al.*, 2004).

O gênero *Vriesea* Lindl., pertencente à subfamília Tillandsioideae, é representado por vinte espécies no Rio Grande do Sul, que ocorrem principalmente no litoral norte do Estado, nas regiões da Mata Atlântica (Reitz, 1983). Muitas destas apresentam alto potencial ornamental, sendo alvo de extrativismo, o que tem acelerado o processo de erosão genética. Além disso, a propagação vegetativa das bromélias na natureza é lenta, devido ao baixo número de brotos laterais produzidos pelas plantas, após o florescimento (Mercier & Kerbauy, 1995; Carneiro *et al.*, 1999). Por outro lado, o uso de sementes também não supre as necessidades de propagação dessas plantas, pois as taxas de germinação no ambiente natural, em geral, são baixas (Mercier & Kerbauy, 1995), e o estágio juvenil da planta é bastante longo (Hosoki & Asahira, 1980). Várias espécies do gênero *Vriesea* constam na lista de espécies vulneráveis e em perigo de extinção, dentre as quais está *Vriesea*

*gigantea* Gaudich., uma espécie epífita de tanque, nativa do RS (Rio Grande do Sul, 2003).

A cultura de tecidos é uma ferramenta para a propagação vegetal em larga escala. A homogeneidade genética depende da escolha do tipo de explante. A utilização de sementes é uma estratégia para a conservação da diversidade genética. Por outro lado, o uso de explantes somáticos derivados de uma planta mãe caracteriza a clonagem, que é importante para a multiplicação de genótipos específicos, produzindo um grande número de plantas homogêneas com qualidade estética e fitossanitária que possam ser comercializados, aliviando a pressão sobre as populações naturais (Hummer, 1999).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a cultura *in vitro* de espécies da família Bromeliaceae (Mercier & Kerbauy, 1997; Daquinta *et al.*, 1998; Alves & Guerra, 2001; Dal Vesco *et al.*, 2001; Arrabal *et al.*, 2002; Rech Filho *et al.*, 2005). Especificamente para *Vriesea gigantea*, um protocolo de micropropagação foi descrito por Droste *et al.* (2005), embora a eficiência da taxa de multiplicação relatada tenha sido baixa.

O objetivo do presente trabalho foi otimizar o protocolo de micropropagação de *Vriesea gigantea*, por meio da investigação do efeito da aplicação de baixas concentrações dos reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA).

## Material e Métodos

Cápsulas maduras de *Vriesea gigantea* foram obtidas da coleção de bromélias da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Excisas das plantas doadoras encontram-se depositadas no Herbário Alarich Schulz da referida Instituição. As cápsulas foram desinfestadas e abertas conforme metodologia descrita por Droste *et al.* (2005). As sementes tiveram seus apêndices plumosos eliminados e foram colocadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro, com 25 ml meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 20 g/l de sacarose e 4g/l de Phytigel™, ajustado em pH 6,0 (antes da esterilização em autoclave). Foram utilizadas 60 sementes, distribuídas em três placas, que foram submetidas à temperatura constante de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16h luz, à intensidade luminosa de  $22,5 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após 45 dias, foi calculada a porcentagem de germinação.

Plântulas obtidas a partir de sementes foram transferidas para meio de cultura MS suplementado com 20 g/l de sacarose e 4g/l de Phytigel™ e com pH ajustado para 6,0. Nesta etapa, foram testadas duas combinações dos reguladores vegetais BAP e NAA: (MS1) meio MS descrito acima suplementado com 1,0 mg/l de BAP e 0,2 mg/l de NAA; (MS2) meio MS descrito acima suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de NAA. A unidade experimental foi o tubo de ensaio contendo 20 ml de meio de cultura e

uma plântula. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, 20 unidades experimentais e quatro repetições por tratamento. Após seis e oito meses, com subculturas mensais, foi contado o número de brotos obtidos a partir de cada plântula inicial nos dois tratamentos. As médias foram submetidas ao teste t de Student, ao nível de significância de 0,05.

Os brotos obtidos foram transferidos para frascos com 30 ml de meio MS contendo 0,2 mg/l de NAA, 20 g/l de sacarose, 5 g/l de carvão ativado, 4 g/l de Phytigel<sup>TM</sup> e com pH ajustado para 6,0, onde permaneceram por três meses. Após este período, o comprimento da folha maior de cada plântula foi medido e as médias foram comparadas pelo teste t de Student, ao nível de significância de 0,05. Plântulas com pelo menos 1,5 cm foram transferidas para copos plásticos contendo vermiculita, cobertos com filme plástico, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade das etapas anteriores. Após 14 dias, as plântulas enraizadas foram transferidas para vasos com solo e submetidas a condições ambientais externas.

## Resultados e Discussão

A porcentagem de germinação foi de 100%. Estes resultados são similares aos encontrados na literatura para outras espécies do gênero *Vriesea* (Mekers, 1977; Mercier & Kerbauy, 1994) e confirmam os dados previamente obtidos para a espécie (Droste *et al.*, 2005; Matos & Droste, 2005).

Na etapa de multiplicação, os meios com as duas combinações de BAP e NAA levaram à proliferação de brotos, a qual pôde ser observada a partir do segundo mês em meio com os reguladores vegetais. O meio MS2, suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de NAA, apresentou o maior número de brotos adventícios ( $t=3,445$ ;  $p=0,002$ ), resultando em uma média de 5,9 e 20,9 brotos por plântula após seis e oito meses, respectivamente (Tabela 1). Mercier & Kerbauy (1992) obtiveram 22 e sete brotos por plântula inicial, respectivamente, para *Vriesea fosteriana* L. B. Smith e *V. hieroglyphica* (Carrière) Morren, utilizando 2,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de NAA, usando o meio básico K (Knudson, 1946) que havia sido indicado por Mekers (1977) como sendo benéfico para a sobrevivência e multiplicação de plantas do gênero *Vriesea*. Embora diversas publicações posteriores tenham ratificado a vantagem do uso do meio K, mostrando que a sobrevivência e a taxa de multiplicação *in vitro* de espécies do gênero *Vriesea* são maiores em meios com baixas concentrações de sais, como no referido meio (Mercier & Kerbauy, 1994; Endres & Mercier, 2003), a mesma não pôde ser comprovada para *V. gigantea*, para a qual ocorreu uma maior multiplicação de brotos no meio MS, quando comparado ao meio K (Droste *et al.*, 2005). Neste trabalho, a combinação de 2,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de NAA resultou em uma média de 3,1 brotos por plântula após quatro meses, quando usado o meio MS, e uma

média de 0,55 brotos por semente, quando usado o meio K (Droste *et al.*, 2005).

Tabela 1: Efeito do meio de cultura MS suplementado com BAP e NAA sobre o número de brotos e o tamanho da folha maior de plântulas de *Vriesea gigantea*.

Meio	BAP <sup>2</sup> (mg/l)	NAA <sup>3</sup> (mg/l)	Número de brotos/plântula (média ± EP <sup>1</sup> )		Comprimento da folha maior (cm) (média ± EP)
			6 meses	8 meses	
MS1	1	0,2	2,32 ± 3,21	6,50 ± 1,69	1,65 ± 0,11
MS2	0,5	0,1	5,90 ± 7,13	20,92 ± 3,83	1,42 ± 0,06
p-valor <sup>4</sup>				0,002	0,059

<sup>1</sup>erro-padrão

<sup>2</sup>6-benzilaminopurina

<sup>3</sup>ácido  $\alpha$ -naftalenoacético

<sup>4</sup>p-valor obtido de acordo com o teste t de Student.

O uso de meios de cultura suplementados com BAP e NAA tem sido associado com eventos morfogênicos na cultura *in vitro* de Bromeliaceae. Recentemente, Rech Filho *et al.* (2005) descreveram um eficiente sistema de proliferação de *Vriesea reitzii* Leme & Costa, utilizando o meio MS líquido suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 0,2 mg/l de NAA, resultando, após 12 semanas, em 20 brotos por explante. No entanto, para a micropropagação de *V. gigantea*, concentrações de BAP e NAA menores de 2,0 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente, não haviam sido testadas até o presente e tampouco havia se obtido um número expressivo de brotos adventícios.

Após 12 meses em cultura, o comprimento de folha maior das plântulas foi, em média, de 1,65 cm no meio MS1 e de 1,42 cm no meio MS2, valores sem diferença estatística significativa ( $t=1,895$ ;  $p=0,059$ ) (Tabela 1). Na etapa de regeneração, foram adicionados 0,2 mg/l de NAA e 0,5% de carvão ativado ao meio, pois ambos os componentes se mostraram benéficos para *Vriesea gigantea* (Droste *et al.*, 2005; Matos & Droste, 2005). O efeito do carvão ativado se deve, provavelmente, à adsorção de substâncias inibidoras e/ou tóxicas derivadas do meio de cultura (Kohlenbach & Wernicke, 1978), de auxinas e citocininas (Weatherhead *et al.*, 1978), agentes quelantes (Heberle-Bors, 1980) e substâncias fenólicas (Fridborg *et al.*, 1978). Plântulas transferidas para vasos com solo e aclimatadas *ex vitro* apresentaram 100% de sobrevivência.

No presente estudo, sementes de *Vriesea gigantea* puderam ser cultivadas *in vitro* no meio MS, apresentando altas taxas de multiplicação de

brotos e regeneração de plântulas com baixas concentrações de BAP e NAA. Após oito meses em meio de cultura com reguladores vegetais, uma multiplicação de brotos adventícios 2,5 vezes (MS1) e 3,5 vezes (MS2) maior, comparada com a média obtida após seis meses, indicou ser necessária a permanência das plântulas em cultura por um tempo maior, para a indução de múltiplos brotos, o que pode estar relacionado ao lento ritmo do desenvolvimento ontogenético natural das bromélias (Hosoki & Asahira, 1980). Além disso, houve um incremento de seis vezes no número de brotos adventícios obtidos em relação aos dados de Matos & Droste (2005), quando foram utilizadas concentrações mais altas de BAP e NAA. Para determinadas espécies, concentrações relativamente altas de BAP podem causar um efeito tóxico e, portanto, menores concentrações são preferidas (Rech Filho *et al.*, 2005). Comparado com os resultados previamente alcançados, o protocolo evidenciou um importante incremento na taxa de multiplicação *in vitro* de *Vriesea gigantea*.

**Agradecimentos:** À FAPERGS, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica (Processo nº 03501504). À Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB), pela concessão das cápsulas.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, G. M. & GUERRA, M. P. 2001. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society* 51(5): 202-212.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J. & MANSUR, E. 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.
- CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J. & MANSUR, E. 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 79-83.
- COFFANI-NUNES, J. V. 2002. Bromélias. In: SIMÕES, L. L. & LINO, C.F. (eds.) *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. São Paulo: SENAC, pp. 119-132.
- DAL VESCO, L. L.; PINTO, A. A.; ZAFFARI, G. R.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. & GUERRA, M. P. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits* 56: 143-154.

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

DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V. & ALMEIDA, J. W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(5): 717-722.

ENDRES, L. & MERCIER, H. 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 181-187.

FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTRÖM, L. & ERIKSON, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologia Plantarum* 43: 104-106.

HEBERLE-BORS, E. 1980. Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther culture of *Nicotiana* and *Atropabelladonna*. *Zeitung der Pflanzenphysiologie* 99: 339-347.

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

HUMMER, K. E. 1999. Biotechnology in plant germplasm acquisition. In: BENSON, E. E. (ed.) *Plant Conservation Biotechnology*. London: Taylor & Francis, pp. 25-39.

JOHANSSON, L. 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiologia Plantarum* 59: 397-403.

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

KOHLNBACH, H. M. & WERNICKE, W. 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Zeitung der Pflanzenphysiologie* 86: 463-472.

MATOS, A. V. & DROSTE, A. 2005. Efeito de agentes gelificantes e do carvão ativado sobre a propagação *in vitro* de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). *Acta Biologica Leopoldensia* 27(1): 5-9.

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

MERCIER, H. & KERBAUY, G. B. 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 247-249.

MERCIER, H. & KERBAUY, G. B. 1994. *In vitro* multiplication of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Bromeliad* 44: 120-124.

MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16: 147-149.

- MERCIER, H. & KERBAUY, G. B. 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 40. Berlin: Springer Verlag, pp. 43-57.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V. & GUERRA, M. P. 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 14: 1799–1808.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. In: REITZ, R. (ed.) *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 808.
- RIO GRANDE DO SUL. 2003. Decreto nº 42.099, de 31 de dezembro de 2002. *Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Lex.* - Diário Oficial do Rio Grande do Sul, ano LXII, nº 1, p. 1-6.
- ROCHA, C. D. R.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A. F.; ROCHA-PESSÔA, T. C.; DIAS, A. S.; ARIANE, C. V. & MORGADO, L. N. 2004. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. *Vidalia* 2(1): 52-68.
- WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J. & HENSHAW, G. G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Zeitung der Pflanzenphysiologie* 89: 141-147.