



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



LÍRIO LUIZ DAL VESCO

**CULTURAS NODULARES E MICROPROPAGAÇÃO DE
BROMÉLIAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA (*Billbergia zebrina* e
Vriesea reitzii): BASES PARA A CONSERVAÇÃO E PROPAGAÇÃO
MASSAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca
da Universidade Federal de Santa Catarina

- D136c Dal Vesco, Lirio Luiz
Culturas nodulares e micropropagação de
bromélias nativas da Mata Atlântica (*Billbergia
zebrina* e *Vriesea reitzii*): Bases para a conservação
e propagação massal
/Lirio Luiz Dal Vesco; orientador Miguel Pedro
Guerra.- Florianópolis, 2010.
91 p.: il., grafs, tabs.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais
Inclui bibliografia.
1. Bromeliaceae - Micropropagação e Conservação.
2. Brotos adventícios. 3. Cultura nodular. 4.
Diversidade (Genética). 5. Histologia. 6.
Microscopia Eletrônica de Varredura. 7. TM - 1998.
I. Guerra, Miguel Pedro. II. Universidade Federal de
Santa Catarina - Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.
- CDU: 635.9

**CULTURAS NODULARES E MICROPROPAGAÇÃO DE BROMÉLIAS
NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*):
BASES PARA A CONSERVAÇÃO E PROPAGAÇÃO MASSAL
por**

Lírio Luiz Dal Vesco

Tese julgada e aprovada em 23/04/2010. em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Comissão Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CC/UFSC

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Presidente e Orientador (CCA/UFSC)

Dr. Gilmar Roberto Zaffari
Membro (EPAGRI)

Profa. Dra. Rosete Pescador
Membro (FURB)

Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
Membro (CCA/UFSC)

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Membro (CCA/UFSC)

Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis
Coordenador do Programa

Florianópolis, abril de 2010

“Vivemos neste mundo para nos esforçarmos em aprender sempre, para nos esclarecermos uns aos outros por meio das trocas de idéias, e para nos aplicarmos a ir sempre mais longe às ciências e nas artes.”

WOLFGANG AMADEUS MOZART

(1756-1791)

À

CATARINA,

EMANUELA,

ANDRÉ LUIZ E

AMADEUS.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PG-RGV) da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela orientação, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho, por sua compreensão, paciência e amizade desfrutada por todo esse período.

Aos pesquisadores e atualmente professores da UNIPAMPA Dr. Valdir M. Stefenon (São Gabriel-RS) e Dr. Leocir Welter (Itaqui-RS) pelas orientações e apoio no desenvolvimento das técnicas do marcador AFLP e na realização das análises MegaBACE.

Aos professores e amigos do Depto. de Fitotecnia, especialmente os Professores Aparecido Lima da Silva, Rubens O. Nodari e Maurício Sedrez dos Reis pela oportunidade da formação.

A Professora. Dra. Marisa Santos do Depto. de Botânica pelos ensinamentos e apoio as análises histológicas.

Aos técnicos do LFDGV Maria Luisa e Marcelo (anteriores) e a recém chegada no LFDGV Bióloga Camila Martins.

Aos meus colegas de laboratório LFDGV, Aline, Ana, Camila Cordeiro, Carol, Clarissa, Cristina, Francine, Gustavo, Josiane, Leila, Lin, Maria Luiza, Paulo, Ramon, Sarah, Vitor e Yohan.

A técnica Eliana Medeiros do LCME da UFSC pelo auxílio às análises no MEV.

A Bernadete Ribas, secretaria do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais/UFSC, pela paciência e pelo apoio constante.

A CAPES e ao CNPq, pelos apoios financeiros nas concessões das bolsas, permitindo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo constantes durante o curso: de coração, à minha esposa Cati, eterna amiga e companheira, zelando da família e apoiando de múltiplas formas; a minha filha Emanuela e meus filhos André Luiz e Amadeus, por existirem e oportunidade de participarem desta família, ser minha alegria, minha luz e que nela devo caminhar; à minha Sogra Terezinha e meus cunhados Cleide e Minga pelo acolhimento, dedicação, orientação e constante apoio na manutenção da harmonia e bom convívio da vida familiar; aos meus pais, pela oportunidade de estar aqui e pela educação e formação.

A Deus e aos bons espíritos, pela inspiração, oportunidade e proteção. Pela saúde, excelente família e amigos que tive a felicidade conviver e de encontrar nesse período.

Por fim, a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE.....	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
5. CAPÍTULO 1.....	15
Indução de brotos adventícios em larga escala de <i>Billbergia zebrina</i> a partir de culturas nodulares: implicações na propagação massal e conservação.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
6. CAPÍTULO 2.....	41
Indução de culturas nodulares e regeneração <i>in vitro</i> de microbrotos em <i>Vriesea reitzii</i> a partir de explantes foliares e sementes.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
7. CAPÍTULO 3	68
Morfogênese <i>in vitro</i> e regeneração de brotos adventícios em grande escala a partir de culturas nodulares de <i>Vriesea reitzii</i>	68
RESUMO.....	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
9. LISTA DE PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DO DOUTORADO	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - ácido indolil-3-acético

AIB - ácido indolil-3-butírico

AFLP = polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado
(Amplified Fragment Length Polymorphism)

ANA - ácido α -naftalenoacético

ANOVA = Análise da Variância

BAP - 6-benzilaminopurina

CNs - Culturas Nodulares

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

2-iP - N⁶(2-isopentenil) adenina

2,4-D - 2,4-ácido diclorofenoxiacético;

AG₃ - ácido Giberélico;

MS - formulação salina de Murashige & Skoog (1962);

MSB - meio MS básico

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

SNK = teste Student-Newman-Keuls

TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)

RESUMO

As bromélias representam um grupo taxonômico importante sob os prismas ecológico e econômico, ocorrendo majoritariamente no bioma Mata Atlântica, o qual se encontra entre os mais ameaçados do planeta. Assim, o desenvolvimento das tecnologias que utilizam sistemas regenerativos de alta eficiência de cultivo ou de conservação de germoplasma vegetal apresenta alto potencial de aplicação. No presente trabalho o sistema de micropropagação baseado na indução e desenvolvimento de culturas nodulares (CNs) foi estudado e caracterizado a partir de segmentos nodais extraídos de brotos estiolados em *Billbergia zebrina*, e a partir de sementes e de bases foliares em *Vriesea reitzii*. Foi também testada a suplementação ao meio de cultura MSB de diferentes tipos, concentrações, balanços de fitorreguladores e submetidos a diferentes condições de cultivo, durante a indução, regeneração e alongamento de microbrotos. Em *B. zebrina*, segmentos nodais, extraídos de brotos estiolados foram cultivados em meios de cultura MS líquido, suplementados com diferentes concentrações de TDZ, ANA e BAP. CNs e folhas de brotações foram empregadas para análises moleculares por meio de marcadores AFLP. O uso do meio de cultura MS com diferentes concentrações de TDZ resultou em CNs com diferentes morfologias e potenciais regenerativos. CNs induzidas com TDZ (0,01 μM) e subcultivadas em meio de cultura MSB isento de fitorreguladores apresentam alta frequência regenerativa. CNs originadas em meio com TDZ, (0,1 μM) quando foram subcultivadas em MSB com ANA (2 μM) e 2-iP (4 μM) resultaram em maior número médio de brotos adventícios por grama de CN inoculada. Brotos alongados (>3 cm) foram aclimatizados com sucesso em ambiente *in vivo* e mudas transplantadas para vasos apresentaram padrão normal da espécie. Análises histológicas e em MEV revelaram que a indução de CNs ocorreu a partir da região da gema do segmento nodal e confirmaram características morfogenéticas intermediárias entre organogênese e embriogênese somática, típico de CNs. A análise molecular com base na técnica de AFLP revelou 88% de similaridade dos regenerantes em relação à planta mãe, sugerindo a ocorrência de alta diversidade. Esta diversidade pode ter aplicação em programas de melhoramento genético ou como ferramenta eficaz em programas de conservação desta espécie. Em *V. reitzii* foram estudados os fatores determinantes do controle da morfogênese *in vitro* das CNs. Os fitorreguladores suplementados ao meio MSB inibiram a germinação das sementes e promoveram a indução de CNs após duas semanas em

cultivo. CNs induzidas em meio suplementado com ANA (4 μM) e subcultivadas em meio MSB com ANA e 2-iP (2 μM cada) apresentaram textura granular e alta taxa de proliferação. O cultivo destas CNs em meio MSB suplementado com AIA (4 μM) resultou em alto número médio de microbrotos (1.468 brotos/g de CNs). A partir do modelo de regressão foi possível inferir que o número máximo de brotos alongados (66,3 brotos/g) pode ser obtido com o subcultivo dos microbrotos em meio MSB suplementado com AIA (2 μM) e AG₃ (10 μM). Em explantes foliares, em todos os meios de cultura testados observou-se a indução de CNs a partir da região basal. Estas CNs responderam de forma diferencial aos tratamentos em termos de características morfogênicas e potencial regenerativo. CNs mantidas na presença de luz resultaram em maior produção de massa fresca e de microbrotos em comparação com aquelas mantidas na ausência de luz. CNs subcultivadas em meio MSB líquido e suplementado com ANA (4 μM) e 2-iP (2 μM) revelaram elevada eficiência regenerativa. A maior eficiência regenerativa e proliferação de microbrotos foram obtidas com o uso do meio MSB suplementado com ANA e 2-iP (2 μM cada). O subcultivo em meio MSB suplementado com AG₃ (10 μM) promoveu um maior alongamento de brotos e de forma sincronizada. A utilização destes meios de cultura resultou em uma eficiência regenerativa de 12,4 g/g de CN inoculada. Estima-se, a partir disto, uma regeneração de mais de 5.300 novos microbrotos e na fase de alongamento, uma taxa efetiva de 75% destes microbrotos podem ser convertidos em brotos completos a cada 10 semanas de cultivo. As análises estruturais das CNs revelaram que os processos de indução da morfogênese e da regeneração de microbrotos ocorrem a partir da proliferação de grupos de células meristemáticas e que desenvolvem a formação de múltiplos meristemas caulinares. Estas estruturas regenerativas sustentam a classificação de CNs organogênicas. Brotos maiores do que 3,0 cm resultaram em mais de 95% de sobrevivência *ex vitro*. Os resultados obtidos com as CNs de *V. reitzii* se configuram, com base em estudos morfohistológicos, em uma rota regenerativa *in vitro* intermediária entre a organogênese e a embriogênese somática. Esta rota apresenta elevado potencial regenerativo para a propagação em larga escala de bromélias ornamentais e/ou ameaçadas de extinção, como são o caso de *V. reitzii* e *B. zebrina*.

Palavras chaves: AFLP; Bromeliaceae; Brotos adventícios; Conservação; Cultura nodular; Diversidade Genética. Histologia; Microbrotos; Micropropagação; Microscopia Eletrônica de Varredura; Propagação clonal.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioma Mata Atlântica e Importância Ecológica das bromélias

A floresta neotropical atlântica é um bioma que se estende desde Rio Grande do Norte à 3°S até o Rio Grande do Sul à 31°S corresponde a 17,4 % (1.481.946 km²) da superfície do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2009). Este bioma é considerado de alta biodiversidade e endemismo de espécies e está entre os 25 *hotspots* em riqueza e em número de espécies do planeta, estimando-se nele a existência de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (Myers *et al.*, 2000). Este bioma apresenta também índices elevados de diversidade de mamíferos, anfíbios, répteis e aves (Heywood, 1995). A magnitude e riqueza deste bioma brasileiro são decorrentes, entre outros, da amplitude climática incluindo regiões heterogêneas de diferente fisionomia e composição florística (Metzger, 2009). Entretanto, é preocupante o empobrecimento gradativo de espécies arbóreas (Silva & Tabarelli, 2000) e à persistência da perda destes habitats e suas conexões leva em efeito cascata e numa amplitude maior na perda da biodiversidade, sabendo que, a extensão destes efeitos ainda é pouco compreendida (Lopes *et al.*, 2009).

O bioma Mata Atlântica é um dos mais ameaçados do planeta. Decorrente do avanço dos maiores centros urbanos e rurais do país este bioma foi o que mais sofreu com perdas florestais (Silva & Tabarelli, 2000, Metzger, 2009). Na forma de fragmentos, restam apenas em torno de 7-8 % dos remanescentes primários e menores de 100 ha (Galindo-Leal & Câmara, 2003). Quando são incluídas as florestas secundárias as estimativas apontam para 11,4 % a 16 % de cobertura e a atual fragmentação deste ecossistema revela que mais de 80% dos fragmentos de cobertura primária são inferiores a <50 ha (Ribeiro *et al.*, 2009). Na tentativa preservar este bioma, nas duas últimas décadas, cientistas têm concentrado esforços para o entendimento das relações ecológicas entre as espécies, visando à proteção dos remanescentes florestais ainda existentes ou de sua restauração (Ribeiro *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009).

Este bioma oferece também refúgio para muitas espécies da família Bromeliaceae que, além da maior riqueza de espécie, abriga populações de espécies com acentuado endemismo nas Regiões Sul e no Sudeste do Brasil (Reitz, 1983, Martinelli, 2000). No Estado de Santa Catarina 31 espécies de bromélias são endêmicas de um total de 137 espécies citadas por Reitz (1983), sendo, portanto, um grupo taxonômico de alta riqueza em diversidade genérica e específica (Martinelli *et al.*, 2008). A ameaça continua pela destruição e

fragmentação dos habitats naturais em que às mesmas ocorrem é agravada pelo fato de a maioria delas serem epífitas.

As bromélias consistem em um subsistema ecológico complexo que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais em função do seu alto grau de especialização e de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (Benzing, 2000; Aranda-Peres & Rodriguez, 2006). Em função de seus efeitos ornamentais e paisagísticos, elas têm sido extraídas desordenadamente de seus habitats naturais e comercializadas em todo o país (Coffani Nunes, 2002).

1.2. Descrição Botânica e ocorrência

A família Bromeliaceae contém 58 gêneros e 3172 espécies e subespécies (Luther, 2008) e mais de 50% das espécies são epífitas (Martinelli, 2000). Todas elas são nativas do Continente Americano, com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana*, que habita a costa ocidental da África (Reitz, 1983). Taxonomicamente as bromélias estão divididas em três subfamílias: Pitcairnioidae, Bromelioideae e Tillandsioidae, baseando-se em análises comparativas entre as estruturas reprodutivas, as quais são consideradas conservativas, porque as alterações são poucas influenciadas pelo meio ambiente, comparativamente às estruturas vegetativas (Reitz, 1983).

Dentro da subfamília Bromelioideae encontra-se o gênero *Billbergia* Thunb., com 64 espécies e 26 variedades e formas (Luther, 2008) distribuídas desde a América Central até o sul da América Meridional (Smith & Downs 1979), sendo a Mata Atlântica o centro de diversidade deste gênero (Barros e Costa, 2008). Já, o gênero *Vriesea* pertence à subfamília Tillandsioidae contém 261 espécies e 44 variedades e formas (Luther, 2008), distribuídas nas Américas a partir do México e Cuba até o sul do Brasil e Norte da Argentina (Smith & Downs, 1977).

A distribuição das bromélias depende essencialmente de fatores climáticos. Das 137 espécies de ocorrência no Estado de Santa Catarina (Fig. 1A), Reitz (1983) observou a presença de 117 espécies (85%) na Floresta Ombrófila Densa e Encosta Atlântica, 37 espécies (27%) no domínio da Floresta de Ombrófila Mista (Mata de Araucária) e 11 espécies (8%) na Floresta Estacional Decidual (Floresta Decidual do Rio Uruguai). Ao longo do litoral do Estado de Santa Catarina, dominado pela Mata de Encosta Atlântica a temperatura e a precipitação média anual caem 2°C e 500 mm, respectivamente, no sentido norte-sul. 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. Das 117 espécies e variedades que se encontram na região da encosta atlântica (Fig. 1B), 94 (80%) espécies ocorrem no norte do Estado e chegam à serra de Tijucas, 62 (53%) vão até a serra do Tabuleiro e somente 41 (35%) espécies chegam à fronteira sul (Reitz, 1983).



Figura 1. A) Distribuição das 137 espécies de bromélias nas três diferentes regiões fitogeográficas de SC e **B)** Distribuição e quantificação de bromélias no sentido norte-sul até cada barreira geográfica da Floresta de Encosta Atlântica de SC. Fonte: Reitz (1983).

No entanto, muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção em Santa Catarina, tal como, *Aechmea apocalyptica* Reitz, *Aechmea blumenavii* Reitz, *Aechmea kleinii* Reitz, *Aechmea pimenti-velosoi* Reitz, *Billbergia alfonsi-joannis* Reitz, *Dyckia cabreræ* L.B.Smith et Reitz, *Dyckia distachya* Hassl., *Dyckia ibiramensis* Reitz, *Vriesea biguassuensis* Reitz, *Vriesea brusquensis* Reitz, *Vriesea muelleri* Mez, *Vriesea pinottii* Reitz, *Vriesea triangularis* Reitz (Brasil-MMA, 2008).

1.3. Conservação *in vitro* e sistemas de micropropagação de Bromélias

Na conservação de germoplasma de bromélias podem ser utilizadas diferentes estratégias que se amparam em estudos de diversidade genética (Barbará et al., 2007, 2009), de evolução e posição filogenética (Schulte et al., 2009), de ecologia, levantamento e caracterização em habitat naturais (Bonnet & Queiroz, 2006; Barbará et al., 2008), bem como, em sistemas de conservação *in situ* (Alves et al., 2004, Martinelli et al., 2008) e *ex situ* (Pompelli & Guerra, 2004).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais compreendem ferramentas que podem ser empregadas para a conservação destas espécies, notadamente aquelas ameaçadas de extinção (Guerra & Dal Vesco, 2010). Vários estudos neste sentido foram realizados com várias espécies, entre as quais *Vriesea fosteriana* (Mercier & Kerbauy, 1992),

Vriesea hieroglyphica (Mercier & Kerbauy, 1994), *Cryptanthus sinuosus* (Carneiro *et al.*, 1998 e Arrabal *et al.*, 2002), *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (Alves & Guerra, 2001), *Dyckia distachia* (Pompelli & Guerra, 2004), *V. gigantea* e *V. philippocoburgii* (Droste *et al.*, 2005), *V. Reitzii* (Rech Filho *et al.*, 2005, Alves *et al.*, 2006) e *Tillandsia eizii* (Pickens *et al.*, 2006). Estas técnicas podem, também, ainda possibilitar a propagação massal de bromélias com importância e interesse ornamental, visando reduzir a pressão de coleta nos ambientes naturais. Neste caso o emprego das técnicas de cultivo *in vitro* em bromélias aumenta a taxa de multiplicação das espécies de interesse (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006, Guerra & Dal Vesco, 2010), quando comparado ao sistema convencional de propagação por divisão natural de brotações.

Como mencionado anteriormente, técnicas de cultura de tecidos vegetais são ferramentas importantes para a conservação de germoplasma vegetal, evidenciado pelas oportunidades que se criam para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas (Withers & Williams, 1998). Métodos de conservação *in vitro* de plantas baseiam-se, grosso modo, nas técnicas empregadas para a micropropagação de plantas. As sementes são os materiais vegetais preferidos para a propagação por permitirem a manutenção da base genética da população original (Fay, 1992, Winkler *et al.*, 2005, Pickens *et al.*, 2006, Aranda-Peres & Rodriguez, 2006, Guerra & Dal Vesco, 2010). As técnicas *in vitro* podem contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação de doenças, quarentena, multiplicação, caracterização e avaliação, armazenamento e distribuição de germoplasma (Withers & Williams, 1998).

O estabelecimento de protocolos e sistemas regenerativos *in vitro* que podem ser aplicados tanto para a conservação quanto para a propagação em grande escala compõem estratégias importantes em bromélias. Alguns padrões de respostas da morfogênese *in vitro*, como os observados em bromeliáceas apresentam características diferenciadas aos sistemas regenerativos tradicionais (Guerra & Dal Vesco, 2009). Assim, as rotas regenerativas *in vitro* a partir de diferentes fontes de explantes podem ser associadas com a organogênese (Mercier & Kerbauy, 1992), embriogênese somática (Pompelli *et al.*, 2005), ou culturas nodulares (Rech Filho *et al.*, 2005, 2009; Alves *et al.*, 2006). Independente da rota o objetivo é a regeneração em larga escala de brotos adventícios de bromélias (Guerra & Dal Vesco, 2010).

1.4. Análise da fidelidade e diversidade genética na micropropagação

A propagação *in vitro* em larga escala de bromélias requer o desenvolvimento de protocolos regenerativos associados à manutenção da fidelidade genética dos indivíduos regenerados quando se trata de propagação clonal. No entanto, programas de conservação ou de melhoramento, requerem a manutenção ou obtenção de variabilidade genética adicional, respectivamente. Independente disto, as respostas morfogênicas *in vitro* ocorrem em resposta à composição do meio de cultura, ao adequado suprimento de fontes de carbono, ao tipo e balanço de fitorreguladores (Ziv & Chen, 2008, Preece, 2008). O balanço adequado dos nutrientes minerais, por exemplo, possibilita reduzir os teores de fitorreguladores nos meios de cultura, aspecto este que favorece a manutenção da fidelidade genética das plantas regeneradas com a planta mãe, quando o objetivo for à multiplicação clonal (Preece, 2008).

Variação somaclonal é o termo geral utilizado para descrever as variações geradas na cultura de tecido (Larkin & Scowcroft, 1981), principalmente, para o sistema propagação clonal massal (biofábricas). Convencionou-se que a propagação em sistema de biofábrica pode ser interrompida quando forem detectados mais de 5 % de ocorrência de variantes somaclonais (Jaligot et al., 2000). Este evento é um fenômeno comum em culturas de tecidos de plantas *in vitro*, e requer um monitoramento constante para identificar os fatores geradores de variação. Esta fonte de variação, contudo, pode ser incorporada em programas de melhoramento (Jain, 2001). Os principais fatores associados com a possibilidade de variação parecem estar relacionados com a fonte de explantes e com o tipo e a concentração dos fitorreguladores utilizados no meio de cultura (Matthes et al., 2001). O número de subcultivos e a idade das culturas e o genótipo de origem também podem afetar a ocorrência da variação somaclonal (Jain, 2001). Além disto, para cada espécie ou variedade é necessário o desenvolvimento de um protocolo específico para cada sistema de cultivo *in vitro* (Sahijram et al., 2003).

A propagação de plantas pelos métodos indiretos, ou seja, aqueles mediados por calos ou suspensões celulares, tanto na organogênese quanto na embriogênese, pode resultar em maior incidência de variações em relação à planta mãe (George & Debergh, 2008). No entanto, muitas destas variações observadas podem ser do tipo epigenética (Peredo et al., 2006, Preece, 2008). Entretanto, como mencionado anteriormente, estas variações podem ser vantajosas ou desvantajosas dependendo do

objetivo a ser alcançado. O uso bem-sucedido dos somaclones dependente de sua estabilidade genética nas gerações subsequentes, para os quais, o uso de marcadores moleculares pode ser útil como ferramenta de monitoramento destes índices, tanto nos programas de conservação, melhoramento ou de propagação clonal (Jain, 2001, Stefenon et al., 2009).

As variações, normalmente identificadas em sistemas *in vitro*, incluem as variações de origem: 1) epigenética, a qual envolve mecanismos de silenciamento ou ativação de genes que não estão relacionados às aberrações ou mudanças de seqüências gênicas (Kaepple et al., 2000, Sahijram, et al., 2003); 2) genética, associada a mudanças estáveis e raramente revertidas, referentes as variações na constituição genética herdáveis ou de ploidia (Holliday, 2006), e; 3) fenotípicas, as quais são alterações na performance e na produtividade agrônômica (Kaeppler et al., 2000) como a formação de internós curtos em *Saccharum* sp. (Zucchi et al., 2002), ou morfológicas, tais como, as variegações foliares de coloração ou quiméricas que, por exemplo, resultam em crescimento anormal dos meristemas caulinares de *Musa* spp (Sahijram, et al., 2003)

Atualmente, a biologia molecular disponibiliza ferramentas robustas para medir a quantidade de variação genética presente na maioria das espécies. O uso de técnicas moleculares, tal como, AFLPs, SSRs ou microssatélite e RAPDs estão entre os métodos mais apurados de avaliação da estabilidade genética (Jain, 2001).

O uso do marcador AFLP se baseia na amplificação de um conjunto de fragmentos gerados pela digestão do DNA genômico por meio das enzimas de restrição, tal como, as de corte rasos, como a *EcoRI*, a qual cliva sítios específicos do DNA com 6-8 bases, e a *MseI* de corte freqüente onde reconhece sítios de quatro bases. Seu potencial de uso está relacionado ao grande número de marcadores de avaliação, pela produção de um número elevado de fragmentos que compõe na formação da banda. Este fator tornou o uso de AFLP um dos procedimentos moleculares mais recomendados para a genotipagem com vistas à estimativa da diversidade genética e à determinação de uma identificação digital (*barcode*) das espécies (Vos et al., 1995, Mueller & Wolfenbarger, 1999). Além disto, esta análise permite uma abordagem multilocos do DNA genômico, sendo também de alta sensibilidade e reprodutibilidade (Meudt & Clarke, 2007). Tal técnica é promissora para estimar a diversidade genética em plantas e para uso em programas de melhoramento quando comparado com análise de SSRs ou RFLPs (Garcia et al., 2004) ou com RAPD (Barracosa et al., 2008). Além disto,

permite a obtenção de forma precoce, tal como empregado no presente estudo, o monitoramento da estabilidade ou diversidade genética das culturas originadas do cultivo de *in vitro*, bem como da identificação de variação somaclonal (Jain, 2001, Carolan et al., 2002, Polanco & Ruiz, 2002, Garcia et al., 2004, Peredo et al., 2006, Steinmacher et al., 2007, Chuang et al., 2009, Gao et al., 2009, Mo et al., 2009).

1.5. Análise estrutural de culturas *in vitro*

A caracterização estrutural nas diferentes fases do desenvolvimento das culturas *in vitro* é determinante para o entendimento das rotas da morfogênese. Os estudos de análises histológicas revelam a seqüência dos processos e o acompanhamento da formação dos principais estádios de desenvolvimento das culturas *in vitro*. Para estes estudos, geralmente, se utiliza a microscopia óptica (MO) e eletrônica (ME). A microscopia óptica apresenta limitações quanto ao aumento máximo atingido que fica em torno de 2.000 vezes (Maliska, 2009). Quando o interesse maior é obter informações topográficas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é o instrumento mais versátil para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas (Castro et al., 2002). Além disto, a MEV, dependendo do material pode atingir aumentos de até 900 000 vezes, mas normalmente atinge aumentos na ordem de 10.000 vezes. Quando adaptados com detectores de raios-X permite também, a realização de análise química na amostra em observação (Maliska, 2009). Basicamente, as amostras devem possuir a dimensão mínima necessária para o estudo, isto é importante, para obter uma boa imagem (Castro et al., 2002; Maliska, 2009).

Os estudos atuais da morfogênese na cultura de tecidos que utilizam o MEV para análises estruturais, abordam as diferentes fases de desenvolvimento das plantas. Entre estes são registrados desde a germinação e desenvolvimento de plântulas *in vitro* de *Cajanus cajan* (Chandra et al., 2003), imagens das diferentes formas de emergência da radícula durante a germinação *in vitro* das espécies de bromélias *Aechmea bromelifolia*, *A. distichantha*, *Vriesea hieroglyphica*, *V. unilateralis*, *V. friburguensis* e *V. incurvada* várias (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006). No desenvolvimento de gemas adventícias de *T. eizii* (Pickens et al., 2006). Em *Pelargonium x hortorum* observou-se o modelo regenerativo de formação de estruturas embrionárias e formações meristemáticas a partir de explantes de hipocótilo (Madden et al., 2005). A formação e a regeneração múltipla de gemas foram observadas a partir de nódulos organogênicos induzidos a explantes internodais em *Humulus lupulus* var. Nugget. (Fortes & Pais, 2000,

2001) e estudos de deposição de calose durante a formação dos nódulos (Forte et al., 2002). Na adequação dos processos de indução da morfogênese revelando a formação de nódulos foram registrados a partir de explantes de hipocótilo em *Eucalyptus globulus* (Trindade & Pais, 2003). A partir de embriões de *Pinus banksiana* foi descrita uma seqüência de desenvolvimento que culmina na formação de brotos adventícios (Pelletier & Laliberté, 2000). Já, Giridhar et al. (2004) registraram em imagem MEV a formação de ES no estágio lobular a partir de explantes foliares de *Decalepis hamiltonii*. Estes estudos, portanto, buscam estudar os fatores que modulam os processos morfogenéticos das difentes culturas estabelecidas *in vitro*, tendo como base para a manipulação das condições de cultivo (Ziv & Chen, 2008).

2. HIPÓTESE

A rota regenerativa *in vitro* baseada na indução, multiplicação e desenvolvimento de culturas nodulares (CNs) de bromélias nativas da Mata atlântica se configura em uma técnica de micropropagação de alta eficiência para a micropropagação em larga escala de bromélias ameaçadas de extinção e/ou de interesse ornamental.

3. Objetivos

O presente trabalho objetivou avaliar e estudar processos alternativos de cultivo *in vitro* com base na indução e regeneração de brotos adventícios a partir de culturas nodulares (CNs) de *Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*. Análises histológicas e ultraestruturais e com marcadores AFLPs foram utilizadas, respectivamente, para caracterizar esta rota morfogenética e para avaliar a fidelidade clonal ou não das CNs.

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do thidiazuron na indução e desenvolvimento de CN de *Billbergia zebrina* e do potencial de regeneração massal de brotos adventícios;
2. Descrever as características morfogenéticas dos sistemas de indução de CN a partir de base foliar e de sementes de *V. reitzii*, e na regeneração de brotos adventícios cultivados em diferentes meios de cultura e combinações de fitorreguladores associados aos diferentes ambientes de cultivo;
3. Caracterizar através de análises histológicas e de imagens em MEV para identificar os processos da morfogênese *in vitro* em *B. zebrina* e em *V. reitzii*;
4. Avaliar a similaridades das plantas do sistema regenerativo de CN através do marcador AFLP para fins de propagação massal e de conservação.
5. Determinar os fatores limitantes para a produção de mudas micropropagadas em grande escala.

Os resultados referentes aos objetivos propostos são apresentados nesta tese sob o formato de artigos científicos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, G. M., Rech Filho, A., Puchalski, A., Reis, M. S., Nodari, R. O., Guerra, M. P. Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. **Plant Genetic Res.**, v.2, n.1, p.23-28, 2004.
- Alves, G. M.; Guerra, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **J. Bromeliad Soc.**, v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- Alves, G.M.; Dal Vesco, L. L.; Guerra, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** v.110, p. 204–207, 2006
- Aranda-Peres, A.N.; Rodriguez, A.P.M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). **Floriculture, Ornament. Plant Biotech.** 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006, v.4, pp. 644-655.
- Arrabal, R. Amancio , F. Carneiro L.A., Neves L.J. , Mansur, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiv. Conserv.**, v.11, p.1081-1089, 2002.
- Barbara´ T, Lexer C, Martinelli G, Mayo SJ, Fay MF, M Heuertz. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). **Heredity** 101, 285–296, 2008.
- Barbará, T., Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Mol Ecol.**, v.16, p.1981-1992, 2007.
- Barbará, T., Martinelli G, Palma-Silva, Clarisse, Fay MF, Mayo, S. Lexer, C. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). **Annals Bot.**, v.103, p.65-77, 2009.
- Barracosa, P., Lima, M.B. Cravador, A. Analysis of genetic diversity in Portuguese *Ceratonia siliqua* L. cultivars using RAPD and AFLP markers. **Scientia Hort.**, v.118, p.189-199, 2008.
- Benzing, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation.** Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000, 690p.
- Bonnet, A.; Queiroz, M. H. Estratificação vertical de bromélias epifíticas em diferentes estádios sucessionais da Floresta Ombrófila Densa, Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Brás. Bot.**, v. 29, n. 2, p. 217-228, 2006.
- Brasil-MMA - Ministro de Estado do Meio Ambiente, **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.** Instrução Normativa nº. 6 de 23 de setembro de 2008. DOU 24.09.2008.
- 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 sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant tiss. Cult. Biotech.** , v.4, n.3-4, p.153-158, 1998.
- Carolan, J.C, Hook, I.L.I, Walsh, J.J, Hodkinson, T.R. Using aflp markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-cultured

- Papaver bracteatum* (section *Oxytona*). **In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant**, v.38, p.300-307, 2002.
- Castro, L.A.S.R.; Sanhueza, M.V.; Cantillano, R.F.F.; Rocha, N.E. M. Metodologia para observação da camada de cera em maçãs, utilizando microscopia eletrônica de varredura. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 3, p. 774-775, 2002.
- Chandra, A.; Gupta, V.; Burma, P.; Pental, D. Patterns of morphogenesis from cotyledon explants of pigeonpea. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.**, v.39, p.514-519, 2003.
- Chuang, S.J., Chen, C.L., Chen, J.J., Chou, W.Y., Sung, J.M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Hort.**, v.120, p.121-126, 2009.
- Coffani-Nunes, J. V. 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.
- Droste, A.; Silva, A. M.; Matos, A. V.; Almeida, J. W.; *In Vitro* Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Brazilian Arch. Biol. Technol.**, v.48, n. 5, p.717-722, 2005.
- Fay, M. F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.**, v.28, p.1-4, 1992.
- Fortes AM, Pais MS An electron probe X-ray microanalysis study during organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget. **Plant Sci** 160: 933–941, 2001.
- Fortes, A. M. & Pais, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content. **Am. J. Bot.**, v.87, n.7, p.971-979, 2000.
- Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. Atlantic Forest hotspot status: an overview. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.), **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook**. CABS and Island Press, Washington, 2003, pp. 3-11.
- Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M. Sui, X., Wang Q., Kimatu, J.N., Wang, L. In Vitro Micropropagation of *Freesia hybrida* and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets. *J Plant Growth Regul.*, [on line], DOI 10.1007/s00344-009-9133-4. 2009.
- Garcia, A.A.F., Benchimol, L.L., Barbosa1, A.M.M., Geraldi, I.O., Souza Jr, C.L.; Souza, A.P. de. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics Mol. Biol.**, v.27, n.4, p.579-588, 2004.
- George, E.F., Debergh, P.C. **Micropropagation: Uses and Methods**. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ª Edição, Springer, pp. 29-64, 2008.
- Giridhar, P.; Kumar, V.; Ravishankar, G. A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, v.40, p.567-571, 2004.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 2010, v.589, pp.47-66.

- Heywood, V. H. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: UNEP:Cambridge University Press, 1995. 1140p.
- Jain, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.
- Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S., Verdeil, J.L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.):the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Rep.** v.19, p.684-690, 2000.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Mol. Biol.**, v.43, p.179-188, 2000.
- Larkin, P.J, Scowcroft, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet.* v.60, p.443-455, 1981.
- Lopes, A.V., Girão, L.C., Santos, B.A., Peres, C.A., Tabarelli, M. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. **Biolog. Conserv.** v.142, p.1154-1165, 2009.
- Luther, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: **Bromeliad Society International**, 2008. 114p.
- Madden, J.I.; Jones, C.S.; Auer, C.A. Modes of regeneration in *Pelargonium x hortorum* (Geraniaceae) and three closely related species. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.41, p.37-46, 2005.
- Maliska, A. M. Microscopia Eletrônica de Varredura e microanálise. **Apostila LABMAT**, UFSC. [s.d], 98p. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm. Acesso em 06.08.2009.
- Martinelli, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific Am.**, v. 282, p. 86-93, 2000.
- Martinelli, G.; Vieira, C. M.; Gonzalez, M.; Leitman, P.; Piratininga, A.; Ferreira da Costa, A.; Forzza, R.C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.
- Matthes, M., Singh. R., Cheah S.-C., Karp, A. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. **Theor Appl Genet**, v.102, p.971-979, 2001.
- Mercier, H.; Kerbauy, G. B. In vitro culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **J. Bromeliad Soc.**, v.44, p.120-124, 1994.
- Mercier, H.; Kerbauy, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.**, v.30, p.247-249, 1992.
- Metzger, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biol. Conserv.**, v.142, p.1138-1140, 2009.
- Meudt, H.M.& Clarke, A.C. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. **TRENDS in Plant Science**, v.12, n.3, p.106-117, 2007.
- Mo, X.Y., Long, T., Liu, Z., Lin, H., Liu, X.Z., Yang, Y.M., Zhang, H.Y. **AFLP analysis of somaclonal variations in *Eucalyptus globulus***. *Biologia Plantarum*, v.53, n.4, p.741-744, 2009.

- Mueller, U.G. & Wolfenbarger, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends Ecol. & Evol.**, v.14, p.389-394, 1999.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- Pelletier, G., Laliberté, S. Effect of embryo orientation on the developmental sequence of adventitious organogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). **Can. J. Bot.**, v.78, p.1348-1360, 2000.
- Peredo, E.L., Ángeles Revilla, M., Arroyo-García, R., Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. **J. Plant Physiol.**, 163, p.1071-1079, 2006.
- Pickens, K. A.; Wolf, J.; Affolter, J. M.; Wetzstein, H. Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.42, p.348-353, 2006.
- Polanco, C., Ruiz, M.L. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Sci.**, v.162, p.817-824, 2002.
- Pompelli, M. F., Fernandes, D.; Guerra, M. P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (*Bromeliaceae*) - An endangered bromeliad from South Brazil. **Prop. Orn. Plants**, v.5, p.192-98, 2005.
- Pompelli, M. F.; Guerra, M. P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breed.Appl. Biotech.**, v.4, p.273-279, 2004.
- Preece, J. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Prop. Tiss. Cult.** 3^a. Edição, Springer, pp. 403-422, 2008.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L. Nodari, R.O. Lischka, R.W. Müller, C.V.; Guerra, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biod. Conserv.**, v.14, p.1799-1808, 2005.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L.; Guerra, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.909-912, 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.
- Reitz, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1983. 559p.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F., Hirota, M.M., Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p. 1141–1153, 2009.
- Rodrigues, R.R., Lima, R.A.F., Gandolfi, S., Nave, A.G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biol. Conserv.**, v.142, p.1242–1251, 2009.
- Schulte, K., Barfuss, M.H.J., Zizka, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Mol. Phylog. Evol.**, v.51, p.327-339, 2009.
- Silva, J.M.C., Tabarelli, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, p.72–74, 2000.

- Smith, L.B. & Downs, R.J. **Flora Neotropica**, Monograph n°14, Part 2, Tillandsioideae (Bromeliaceae). New York: Hafner Press, p.663-1492, 1977.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. **Flora Neotropica**, Monograph n°14, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). New York: Hafner Press, p.1493-2142, 1979.
- Stefenon, V.M.; Steiner N.; Guerra M.P; Nodari, R.O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiv. Conserv.**, v.18, p.2433-2448, 2009.
- Steinmacher, D.A.; Saldanha, C.W.; Clement, C.; Guerra, M.P. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **Cryo-Lett.**, v. 28, p. 13-22, 2007.
- Winkler, M., Lber, K.H., Hiet, P. Effect of Canopy Position on Germination and Seedling Survival of Epiphytic Bromeliads in a Mexican Humid Montane Forest. **Ann. Bot.** v.95, p.1039-1047, 2005.
- 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-CBAB. 1: p.297-330. 1998.
- Ziv, M. & Chen J. The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. In: In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Prop. Tiss. Cult.**, vol.1. The Background. 3ª. Edição, Dordrecht: Springer. 2008, pp. 465-477.

5. CAPÍTULO 1

Indução de brotos adventícios em larga escala de *Billbergia zebrina* a partir de culturas nodulares: implicações na propagação massal e conservação.

Lirio Luiz Dal Vesco¹, Valdir Marcos Stefenon¹², Leocir José Welter¹³, Miguel Pedro Guerra^{1*}

RESUMO

A floresta tropical atlântica é um bioma de alta diversidade de espécies de bromélias, com alto endemismo e megadiversidade. A exploração e ocupação desordenada deste ecossistema ameaçam parte significativa de seus componentes. Segmentos nodais, extraídos de brotos estiolados na ausência de luz, foram cultivados em meios MSB líquido, suplementados com diferentes concentrações de TDZ e a associação de ANA e BAP. Culturas nodulares induzidas em todos os tratamentos e folhas de brotações foram empregadas como fonte de explantes para a extração do DNA e o marcador AFLP foi utilizado para a análise de diversidade genética. A suplementação ao meio de cultura MS com diferentes concentrações de TDZ resultou em CNs com diferentes morfologias e potenciais regenerativos. CNs induzidas com 0,01 μM de TDZ e subcultivadas em meio de cultura MS isento de fitorreguladores apresentam alta frequência regenerativa. CNs originadas de 0,1 μM de TDZ, quando foram subcultivadas em 2 μM de ANA e 4 μM de 2-iP promoveram maior número médio de brotos adventícios por grama de inóculo. O subcultivo em meio de cultura basal MS suplementado com 1 μM de ANA e 2 μM de 2-iP promoveu uma maior altura de brotos. Brotos alongados (>3 cm) foram aclimatizados com sucesso em ambiente *in vivo* e mudas transplantadas para vasos apresentaram padrão normal da espécie. Imagens em MEV revelaram que a indução de CN ocorre a partir da região da gema do segmento nodal. Durante a indução, a análise histológica revelou um processo morfológico regenerativo classificado como culturas nodulares. Plantas regeneradas apresentaram similaridade genética maior que 90% na análise AFLP, quando comparadas às plantas-mães, usando o índice de Jaccard. Os resultados deste trabalho mostram que o sistema regenerativo de brotos a partir de CN de *B. zebrina* apresenta-se

¹ Programa de Pós- graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. E-mails: lirio@cca.ufsc.br; mpguerra@cca.ufsc.br * Autor Correspondente.

² Endereço Atual: Universidade Federal do Pampa/Campus São Gabriel, São Gabriel, RS, Brasil. E-mail: valdirstefenon@unipampa.edu.br.

³ Endereço Atual: Universidade Federal do Pampa/Campus Itaqui, RS.

como modelo de estudo e pode ser empregado na conservação ou propagação clonal. O sistema de micropropagação com base na indução de culturas nodulares a partir de segmentos nodais de *Billbergia zebrina* foi caracterizado como um sistema alternativo de cultivo *in vitro*.

Palavras chaves: AFLP, Bromeliáceas, brotos adventícios, cultura de tecidos, diversidade genética, Histologia, microbrotos, propagação clonal.

Abreviatuas: AFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado, ANA-ácido naftalenoacético; BAP - 6-benzilaminopurina; CNs - Culturas nodulares; MSB – meio básico MS; 2-iP - N6 (2-isopentenil) adenina; AG₃ – ácido giberélico; MS – Murashige & Skoog (1962); MEV- microscopia eletrônica de varredura, TDZ-thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea).

ABSTRACT

Induction of adventitious shoots in scale-up of *Billbergia zebrina* derived from nodule cluster cultures: implications for mass propagation and conservation

The Tropical Atlantic Rain Forest is a biome of high diversity and endemism of bromeliad species. The micropropagation system based on the induction of NCs from nodal segments of *Billbergia zebrina* was characterized as an alternative system of *in vitro* culture. Nodal segments extracted from etiolated shoots were cultured in liquid BM supplemented with different PGR. Different concentrations of TDZ and the subculture in culture medium supplemented with different levels of NAA and 2-iP resulted in NCs with different morphologies and regenerative potential. NCs induced with 0.01 μM of TDZ and subcultured in BM free of PGR showed high-frequency of regeneration. NCs originated from 0.1 μM of TDZ, when subcultured in 2 μM of NAA and 4 μM of 2-iP promoted higher mean number of adventitious shoots. Elongated shoots were successfully acclimatized in *in vivo* environment and plantlets transferred to vases presented normal phenotype. Hystological analyses revealed the main features of the NCs. SEM showed that the induction of CN occurred from the basal shoot region of the nodal segment. The results of this study show that the regenerative system of shoots from NCs of *B. zebrina* can be viewed as a system model for morphogenetic studies and regenerative potential. Molecular genetic analysis based on the AFLP technique revealed similarity lower than 90% among regenerated plants and the “mother-plants” suggesting the occurrence high diversity. Such diversity can be used in breeding programs and the AFLP technique revealed to be a powerful tool in genetic conservation programs of the species.

Keywords: AFLP, bromeliads, clonal propagation, genetic diversity, microshoots, regeneration, histology, Shoot-buds, somaclonal variation, tissue culture

Abbreviations: BAP – 6- benzylaminopurine; BM – basal medium; 2-iP - N⁶ (2-isopentyl) adenine; GA₃ - Gibberellic acid; NAA - α -naphthaleneacetic acid; NCs - nodular cultures; PGR - plant growth regulators, SEM - Scanning electron microscopy, TDZ - thidiazuron, AFLP - amplified fragment length polymorphism.

INTRODUÇÃO

A floresta tropical atlântica é um bioma de alta biodiversidade e endemismo, estimando-se a presença de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (Myers et al., 2000). Esta floresta apresenta também índices elevados de diversidade de mamíferos, anfíbios, répteis e aves (Heywood, 1995). Entre os componentes de grande importância ecológica e econômica deste bioma encontram-se as bromélias, as quais, pela fragmentação deste ecossistema e em função de seu valor ornamental foram, ao longo do tempo, extraídas desordenadamente de seus habitats naturais.

As bromélias consistem em um subsistema ecológico complexo que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais, por apresentarem alto grau de especialização em função de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (Padilha 1978; Benzing, 2000; Aranda-Peres & Rodriguez, 2006).

A família Bromeliaceae é composta por 58 gêneros e 3172 espécies e subespécies (Luther, 2008) e mais da metade delas são epífitas (Martinelli, 2000). O gênero *Billbergia* Thunb., pertence a subfamília Bromelioideae a qual compreende 64 espécies e 26 variedades e formas (Luther, 2008) distribuídas desde a América Central até o sul da América Meridional (Smith & Downs, 1979), sendo a Mata Atlântica o centro de diversidade deste gênero (Barros & Costa, 2008).

Billbergia zebrina (Herbert) Lindley é uma bromélia epífita e heliófila nativa na Mata Atlântica, ocorrendo também sob condições de luz difusa (Reitz, 1983). É considerada uma espécie vulnerável no Estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil (RS Biodiversidade, 2009). Esta espécie, além de sua importância ecológica, se destaca também pelo seu valor comercial por sua aptidão ornamental por conta das suas exuberantes folhas e flores (Fig. 1 A). Seu tanque tubular tem capacidade de armazenar uma grande quantidade de água, característica esta importante para a manutenção da diversidade de animais. Em muitos casos, as bromélias com seus microhabitats e seus habitantes parecem ter co-evoluído, como é o caso da espécie de sapo (*Hyla venulosa*), que hiberna ao longo da estação seca no norte do Brasil no interior da folhagem de plantas de *Billbergia zebrina* (Martinelli, 2000).

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de ferramentas que podem ser aplicadas para a conservação e para a propagação massal de bromélias de interesse. Recentemente foi descrita uma rota regenerativa *in vitro* de bromélias baseada na indução de culturas nodulares (CNs) (Rech Filho et al., 2005, Alves et al., 2006, Rech Filho et al., 2009). CNs são definidas como grupos de nódulos organogênicos de forma globular, de coloração verde amareladas a translúcidas, apresentando textura friável a levemente compacta e compostas basicamente por aglomerados meristemáticos que, e em condições de cultivo adequado, resultam na regeneração múltipla de brotos. Sistemas regenerativos similares foram descritos para *Vriesea fosteriana* (Mercier & Kerbauy, 1995), *Cryptanthus* (Koh & Davies Jr, 1997), *Vriesea friburgensis* var. *Paludosa* (Alves & Guerra, 2001), e *V. Reitzii* (Rech Filho et al., 2005, Alves et al., 2006, Rech Filho, 2009). Este padrão morfogenético parece ser afetado pela competência e diferenciação celular do explante e pelo tipo e concentração dos fitorreguladores empregados (Gahan & George, 2008).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do thidiazuron na indução e estabelecimento de culturas nodulares e o potencial de regeneração de brotos adventícios em larga escala. Análises estrutural e histológica foram utilizadas para avaliar a origem dos processos morfogenéticos de regeneração *in vitro* e análise de genética molecular, baseadas na técnica AFLP, foram efetuadas para estudar a correlação entre as plantas matrizes e as culturas regeneradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal - Frutos em maturação fisiológica foram coletados de plantas matrizes de *Billbergia zebrina* (Fig. 1A– detalhes) mantidas na coleção de bromélias do CCA/UFSC foram desinfestados durante 2 min em álcool 70%, 25 min em solução de água sanitária comercial a 40% (2,0-2,5% de cloro ativo) mais um gota de Tween 20 em cada 100 ml de solução. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro tipo conserva (340 ml) contendo 25 ml de meio de cultura MS básico [MSB – macro e microsais de MS (Murashige and Skoog, 1962) mais vitaminas de Morel (Morel and Wetmore, 1951), 30 g L⁻¹ sacarose] e geleificado com 7,5 g L⁻¹ agar (Acros®) e 1.0 g L⁻¹ carvão ativo. O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,5, adicionados ou não de agente geleificante e autoclavados por 15 min a 1,3 kgf cm⁻². Todas as culturas foram incubadas em ambiente com 25 ±2 °C e quando na presença de luz com 40-50 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® branca fria e 16 h fotoperíodo,

com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas (Guerra & Dal Vesco, 2010).

Indução de culturas nodulares – Segmentos nodais com $1,0 \pm 0,3$ cm foram excisados de aproximadamente 100 brotos jovens cultivados por 12 semanas (cinco e sete semanas na ausência e presença de luz, respectivamente) em MSB descrito anteriormente. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio (25 x 150 mm) sobre ponte de papel filtro (3M), contendo 15 mL de MSB líquido, suplementado com diferentes concentrações de fitorreguladores para avaliar o efeito na indução de CN e regeneração de brotos.

O delineamento do experimento foi em blocos completamente casualizado (BCC) com cinco tratamentos: quatro concentrações de thidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol) 5- uréia) - TDZ (0; 0,01; 0,1 e 1,0 μM) e a combinação de ácido α -naftalenoacetico - ANA (2 μM) mais 6-benzilaminopurina - BAP (4 μM) meio de cultura comumente utilizado em bromeliáceas (Guerra & Dal Vesco, 2010). Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaios contendo um segmento de nó com uma gema por tubo e repetidas quatro vezes. Dados de porcentagem de indução de cultura nodulares, número de brotos por classe de altura de brotos e altura (cm) dos brotos foram coletados em nove semanas de cultivo.

Multiplicação e Regeneração de brotos - CNs previamente induzidas em meio de cultura suplementado com TDZ foram subcultivadas em um segundo ensaio, em MSB suplementado com a combinação com os fitorreguladores ANA e N6 (2-isopentenil) adenina (2-iP).

O delineamento do experimento constou de um fatorial de 3x4, com 12 tratamentos: três diferentes meios de cultura: 1) MSB isento de fitorreguladores; 2) MSB + ANA (1 μM) + 2-iP (2 μM); 3) MSB + ANA (2 μM) + 2-iP (4 μM) e combinado com quatro tratamentos da indução das culturas nodulares do experimento 1: TDZ (0,01; 0,1 e 1 μM) e a combinação de ANA (2 μM) e BAP (4 μM). Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaios contendo $0,14\text{g} \pm 0,03\text{g}$ de CN por tubo e repetidas quatro vezes em forma de BCC. As culturas foram mantidas sobre ponte de papel filtro (3M) contendo 15 ml MSB líquido. Dados de peso fresco (g) das CNs, número de brotos por classe de altura de brotos e altura (cm) dos brotos foram coletados em 14 semanas de cultivo. A eficiência regenerativa foi calculada pelo peso fresco final das CNs em relação ao peso inicial (inoculo), com base na fórmula: Eficiência regenerativa = (Peso final – Peso inicial)/Peso inicial.

Manutenção das CNs – CNs foram subcultivadas em tubos de ensaios contendo 15ml de MSB geleificado ou líquido, suplementado com quatro diferentes combinações de fitoregulador: 1) MSB isento de fitoreguladores; 2) MSB +ANA (4 μM) + 2-iP (2 μM); 3) MSB + TDZ (0,01 μM); e; 4) MS + TDZ (0,01 μM) + 2-iP (2 μM). Em cada frasco foi transferido de 1,5-2,0g de CN e os brotos regenerados foram transferidos para meio de cultura MSB para o alongamento. Foram efetuados subcultivos sucessivos e intercalados entre MSB geleificado e líquido. Avaliações da morfologia das culturas foram efetuadas para permitir a manutenção das CN por longo período em cultivo.

Aclimatização – Brotos alongados, obtidos no segundo ensaio, foram transferidos para substratos compostos por uma mistura de substrato comercial Plantmax[®], casca de arroz carbonizada e casca composta de árvores (1:1:1 v/v) dispostas em bandejas de isopor com 128 células. As mudas foram mantidas em ambiente de túnel de nebulização com irrigação intermitente. Para permitir o desenvolvimento as mudas foram transplantadas para vasos de 450 cm³ e 1800 cm³ após três e seis meses respectivamente.

Análise estatística – Porcentagem de explantes com CN, número de brotos por explantes, altura e eficiência regenerativa foram submetidos ao teste F_{max} para verificar heterogeneidade das variâncias (S^2). Quando necessário os dados originais foram transformados em $\log(x+2)$ ou $(x+0,5)^{0,5}$. Estes dados foram submetidos a análise da variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias usando Statgraphics software, versão 7.0. Dados quantitativos foram avaliados pela análise de regressão de acordo com Compton (1994) e Sokal and Rohlf (1995).

Procedimentos Histológicos – Amostras representativas das culturas *in vitro* foram coletadas em diferentes períodos e fixadas em glutaraldeído (2.5 %) em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,2) por 16-18 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram lavadas por três vezes em tampão sem fixativo e desidratadas em série em série etílica (etanol) gradual (10–96 %), por 30 min cada. As amostras foram imersas em solução de pré-infiltração, compostas pela solução de infiltração do Kit de historesina Leica[®] [50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila (ativador)] com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24h e incluídas em solução de infiltração com Endurecedor Leica[®] (dimetil sulfoxido) na proporção de 15:1 (v/v) e orientadas em moldes plásticos. Secções (5-7 μm) foram obtidas usando microtomo de rotação SLEE Technik[®], distendidas em lâminas com uma gota de água e

mantidas por 1-2h a temperatura de 42 ± 2 °C. Após a evaporação da água foram coradas com azul de toluidina O a 0.05% em H₂O e os aspectos relevantes foram identificados e fotografados usando câmara DP 71 acoplada a microscópio BX-40 da Olympus®.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Amostras representativas fixadas de acordo com o item procedimentos histológicos foram desidratadas em série etílicas (10-100 %) por 30 min cada. Em seguida foram colocar em éter etílico (PA) e mantidas em freezer (-20 °C) por 24 horas, procedimento utilizado para substituir o ponto crítico de CO₂. Após evaporar o éter, as amostras foram montadas sobre suporte de alumínio (stub) com dimensões de 9,5 de Ø x 10 mm de altura coladas com fita carbono dupla face. Anteriormente as análises as amostras foram mantidas em sílica e metalizadas com uma fina camada de ouro. Imagens relevantes foram obtidas em microscópio JEOL® modelo JSM-6390LV a 10 kV.

Análises de Genética Molecular - O DNA foi extraído utilizando-se o método CTAB, conforme descrito por Stefenon et al. (2004) a partir de amostra foliar ($\pm 2,5\text{cm}^2$) excisadas de plantas matrizes (Bz1, Bz2 e Bz3, Fig. 1A) e de três amostras aleatórias com $0,85 \pm 0,2$ g de CN dos 12 tratamentos do ensaio de multiplicação. Deste modo, os tratamentos B1.1, B1.2 e B1.3 são três replicatas do tratamento 1, das amostras B2.1, B2.2 e B2.3 são três duplica do tratamento 2 e assim por diante, como amostras representativas das 100 plântulas empregadas na indução. Plantas Bz2 e Bz3 são matrizes para a regeneração das culturas, enquanto a planta Bz1 foi usada como um controle da variação genética natural dentro da espécie. O DNA isolado foi re-suspenso em 75 µL tampão TE e mantidos freezer - 20 °C até o uso. A análise de genética molecular foi executada pela técnica de AFLP (Vos et al., 1995), como descrito por Stefenon et al (2007).

Para a reação de restrição/ligação, cerca de 150 µg de DNA genômico foram incubados com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Mse*I (Fermentas®) e o correspondente adaptadores *Eco*RI e *Mse*I numa simples reação (1X tampão de reação *T4* DNA ligase, 2,5µg de BSA, 0,25 pmol/µL de cada adaptador, 0,07U de *Mse*I, 0,4 U de *Eco*RI, 0,08 U de *T4* DNA ligase, 0,05 µg/µL de BSA, e 0,05mM de MgCl₂), onde foram mantidas em temperatura ambiente de 37 °C por 16 h. O produto desta reação foi diluído com água ultra pura na proporção de 1:3 (v/v) e desta diluição foi utilizado nas reações de pré-amplificação (5 µL de DNA, 1X tampão da *Taq*, 0,08 U *Taq* DNA-polimerase (Fermentas®), 0,25mM de cada dNTP, 0,05 pmol de cada primer e 0,05mM de MgCl₂). A pré-amplificação foi executada com os pares de primers com

uma base seletiva (*Eco*+A e *Mse*+C a 50ng/μL). O programa de PCR constou de uma etapa de 2 min a 94 °C seguido de 26 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C e 1 min a 72 °C e finalizando com 5 min a 72 °C. O DNA pré-amplificado foi diluído com água ultra pura na proporção de 1:9 (v/v) e utilizando nas reações três bases seletivas com a combinação de primer *Eco*RI -AAT + *Mse*I-CAA, CTG, CTC, CAG, CTT e CAT [5 μL de DNA pré-amplificado, 1X de tampão da *Taq*, 0,07 U *Taq* polymerase (Fermentas®), 0,25mM de cada dNTP, 0,08 pmol de primer *Eco*RI-AAT marcado com fluorescência HEX mais 0,16 pmol do primer *Mse*I e 0,05 mM de MgCl₂]. O programa de amplificação seletiva constou de uma etapa inicial de desnaturação por 2min a 94 °C seguido de 12 Ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C para anelamento e 1min:30s a 72 °C para extensão, reduzindo 1°C a cada ciclo. A estes ciclos, seguiram-se mais 23 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 56 °C e 1 min a 72 °C, finalizando com 2 min a 72 °C. Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD).

O produto da PCR foi combinado com o padrão ET-ROX (ET550-R), tween 20 (0,1%), and 1,0 μl de DNA amplificado. Fragmentos de AFLP foram separados por eletroforese em capilares de genotipagem MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os fragmentos foram automaticamente registrados e transformados em uma matriz binária para análise de dados (0 para ausência e 1 para presença do fragmento) usando o Software Fragment Profiler v1.2. Apenas fragmentos entre 50 e 600 bp (picos de altura > 100) foram selecionados para comparação entre os tratamentos. A matriz binária foi analisada em software NTSYSpc 2.0 (Rolf, 1998), para construção da matriz de similaridade utilizando-se do índice do Jaccard como $J_{12} = a/(a+b+c)$, onde *a* é o n°. de fragmentos de AFLP presentes em ambas as plantas, *b* é n°. de fragmentos presentes na planta um, mas não na planta dois e *c* é n°. de fragmentos presentes na planta dois, mas não na planta um. Em análise de grupo usando o algoritmo UPGMA e análise de ordenação (PCO) foram avaliadas pelo mesmo software para visualizar a correlação entre as plantas.

RESULTADOS

Indução das CNs - Brotos de *Billbergia zebrina*, quando cultivados *in vitro* por sete semanas na ausência e mais cinco semanas na presença de luz, permitiu o alongamento dos entrenós e favoreceu a excisão dos segmentos nodais contendo uma gema axilar (Fig. 1B). O uso do MSB isento de fitorreguladores resultou em baixa taxa de proliferação de CN (Fig. 2A) e promoveu o desenvolvimento de um

broto por segmento nodal (Fig. 1C). A diferenciação para CN com coloração verde amarelada foi observada a partir das gemas axilares quando cultivadas na presença de TDZ, após cinco semanas de cultivo (Fig. 1D). A proliferação dos *clusters* de CN com a indução e regeneração múltipla de pequenos brotos adventícios foi observada após nove semanas de cultivo (Fig. 1E).

A taxa de indução de CN aumenta linear e significativamente ($P < 0,01$), em relação ao aumento dos níveis de TDZ ao MSB e, conseqüentemente, o uso de $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ promoveu as maiores taxas de indução de CN (95%), após nove semanas de cultivo (Fig. 2A). No entanto, a maior número de brotos por gemas foi observada com o uso de $0,1 \mu\text{M}$ de TDZ (Fig. 2B). Por outro lado, a altura dos brotos foi inversamente proporcional ao aumento da concentração deste fitorregulador, revelando, portanto, o cultivo em MSB isento de fitorreguladores um maior e significativo ($p < 0,01$) alongamento de brotos (2,8cm) em relação aos meios suplementados com TDZ. Para estes dois parâmetros o modelo quadrático da análise de regressão foi que melhor descreveu a evolução dos dados (Fig. 2B). Alta frequência (>97%) de formação de brotos, da classe de menor de altura (0,5cm) ocorreu quando foi suplementado ao MSB, $0,1$ e $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ (Fig. 2C). O uso BM suplementado com $2 \mu\text{M}$ de ANA e $4 \mu\text{M}$ de BAP resultou também em altas taxas de indução (75%), número de brotos (6,2 brotos/gemas) e altura média de 0,5 cm (dados não mostrados).

Multiplicação e Regeneração de brotos - O subcultivo para novos meios de cultura, no segundo ensaio, favoreceu a diferenciação celular e o desenvolvimento das CN em diferentes padrões morfológicos quanto ao desenvolvimento, proliferação e regeneração de brotos (Fig. 1F-I). O estabelecimento de CN em ciclos repetitivos de proliferação, com textura friável, de coloração marrom a amareladas foram observadas somente nas culturas originadas de $0,01 \mu\text{M}$ de TDZ (Fig. 1F-G). O subcultivo das CNs, por mais de 6 semanas, em MSB isento de fitorreguladores favoreceu a indução *clusters* meristemáticos (Fig. 1F). Após duas a três semanas de cultivo em MSB suplementado com $1 \mu\text{M}$ de ANA e $2 \mu\text{M}$ de 2-iP observou-se a regeneração de microbrotos (Fig. 1G), padrão de resposta para esta rota de indução. Enquanto que, CN induzida com $0,1 \mu\text{M}$ de TDZ e subcultivadas em $2 \mu\text{M}$ de ANA e $4 \mu\text{M}$ de 2-iP diferenciaram-se pelas características morfológicas de coloração verde, textura mais compacta e com o desenvolvimento de múltiplos primórdios foliares, após 8 semanas de cultivo (Fig. 1H). CN originada de MSB suplementado com $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ e subcultivadas

em MSB suplementado com (1-2 μ M) ANA e (2-4 μ M) 2-iP, apresentavam característica morfológica mais compacta que a anterior, porém, foram observados a regeneração múltipla de brotos (Fig. 1I).

As maiores e significativa ($p < 0,01$) eficiências regenerativas das culturas nodulares em aumento de peso fresco ocorreram quando estas culturas foram originadas do MSB contendo 0,01 μ M de TDZ quando subcultivadas em MSB isento de fitorreguladores (MS - 12,3 vezes) e com 1 μ M de ANA e 2 μ M de 2-iP (A1I2 - 11,8 vezes), após 14 semanas em cultivo (Fig. 3A). Por outro lado, CN originadas de 0,1 e 1 μ M de TDZ, quando subcultivadas em 2 μ M de ANA e 4 μ M de 2-iP (A2I4) resultaram em maior e significativo ($p < 0,01$) número médio de brotos adventícios (446 e 412 brotos/g de inóculo, respectivamente), após 8 semanas de cultivo (Fig. 3B). No entanto, o subcultivo das CNs originadas do meio de cultura contendo 2 μ M de ANA e 4 μ M de BAP para meio contendo 1 μ M de ANA e 2 μ M de 2-iP resultou em baixas taxas regenerativas, observando-se porém, um aumento significativo ($p < 0,01$) no alongamento de brotos (Fig. 3C). Observou-se também que, o subcultivo em MSB isento de fitorreguladores promoveu uma alta frequência de brotos nas classes 0,5 cm de altura (Fig. 3D). Enquanto que, o subcultivo das culturas em meio MS suplementado com ANA e 2-iP resultou em maior frequências de brotos das classes superiores a 1,5cm de altura (Fig.3 E-F)

Manutenção das CNs - CN com alta capacidade regenerativa, de textura friável a compacta e em ciclos repetitivos de proliferação (Fig. 1J), foram estabelecidas e mantidas por longo período com o uso de MSB geleificado e suplementado com TDZ (0,01 μ M) + 2-iP (2 μ M). Enquanto que, o uso de meio líquido resulta na regeneração dos brotos (Fig. 1K) e o subcultivo em MSB líquido e isento de fitorreguladores resulta no alongamento dos brotos.

Aclimatização - Brotos alongados e obtidos nos diferentes meios de cultura de multiplicação e regeneração de brotos resultou em mais de 80% de sobrevivência, após seis semanas em ambiente de túnel de nebulização com irrigação intermitente (dados não mostrados). Enquanto que, brotos originados do MSB e isento de fitorreguladores resultaram em 100% de sobrevivência. Mudanças aclimatizadas quando transplantadas para vasos com volume 450cm³ e mantidas em ambiente de viveiro com 50% de sombreamento apresentavam desenvolvimento normal e uma altura média de 12 cm, após três meses *in vivo* (Fig. 1L). O transplante para vasos de maior volume (1800cm³) observou-se após 6 meses, o padrão fenotípico da espécie e com 25 a 30 cm de altura (Fig. 1M).



Figura 1. Indução de culturas nodulares (CN) e a regeneração de brotos advérsios em *Billbergia zebrina*. **A)** Planta matriz, detalhe - flor e fruto; **B)** Segmento de nodal de brotos estiolados com uma gema axilar (seta); **C)** Desenvolvimento do broto em meio de cultura MSB, 5 semanas de cultivo; **D)** Indução e desenvolvimento de CN a partir da gema axilar; **E)** Proliferação de CN e regeneração de brotos em 9 semanas de cultivo; **F-G)** CN induzidas com 0,01 μM de TDZ e subcultivadas por mais 6 semanas: **F)** Em MSB ocorre à indução de novas regiões meristemáticas (setas) e; **G)** em MSB com 1 μM de ANA e 2 μM de 2-iP ocorre a regeneração de microbrotos (setas); **H-I)** Padrão de CN compacta e de coloração verde com o subcultivo em MSB com 2 μM de ANA e 4 μM de 2-iP por 8 semanas e quando induzidas em: **H)** 0,1 μM de TDZ com primórdios foliares e; **I)** Regeneração múltipla de brotos com 1 μM de TDZ; **J)** Manutenção em MSB gelesificado com TDZ (0,01 μM) + 2-iP (2 μM); **k)** regeneração e alongamento de brotos em MSB líquido e isento de fitorreguladores; **L-M)** mudas aclimatizadas em ambiente *in vivo*: **L)** Após 3 meses e; **M)** Após 6 meses com padrão normal. Barra: B,C,F,G,H = 5mm; E,I,J,K = 10mm.

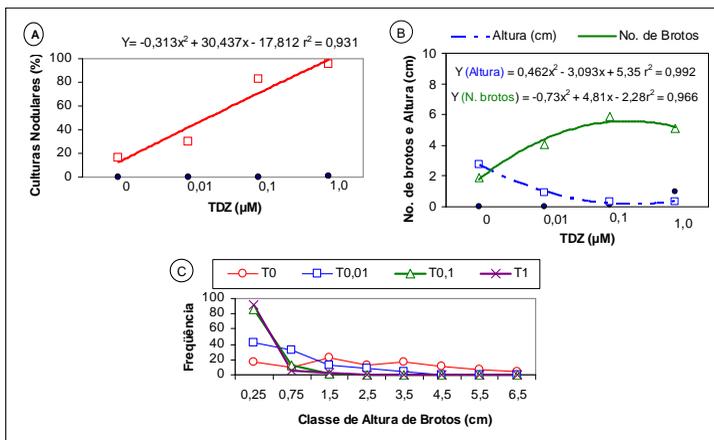


Figura 2. A) Evolução da indução de culturas nodulares (%); B) número médio de brotos regenerados por gemas e altura média dos brotos; C) Frequência média de brotos regenerados por gemas a partir de brotos estiolados de *Billbergia zebrina* em resposta a suplementação ao meio de cultura MS com TDZ (0; 0,01; 0,1 e 1,0 μM) após 9 semanas de cultivo. * Média de quatro repetições. CV (%) = A $120,3\%$; B) Número de brotos 2 $15,6\%$; Altura (cm) 2 $13,3\%$. Dados transformados em $^1 = \log(x+2)$ e $^2 = (x+0,5)^{1/2}$.

Estudos Morfo-histológicos – Imagens obtidas em MEV mostram claramente que a desenvolvimento das CNs ocorrem a partir do segmento nodal em *B. zebrina* e observa-se uma organizada proliferação de calo sobre a região da gema (Fig. 4A), quando comparado com a região entrenós do explante. Após seis a sete semanas de cultivo observa-se CN em proliferação com o início da indução de gemas (Fig. 4B) e em detalhe a formação de doma apical do broto (Fig. 4C). Em secção longitudinal do segmento nodal, coradas com azul de Toluidina O, podem ser observadas estruturas específicas de desenvolvimento, mostrando também uma intensa proliferação de células organizadas na zona nodal (Fig.4D - seta) e em secção transversal pode-se visualizar o centro inicial de proliferação das células competentes (Fig.4E - seta). Neste período, observa-se também a formação zona meristemática na região subepiderme, compostas de camadas organizadas com células pequenas e isodiamétricas (Fig.4F – seta branca). Simultaneamente observa-se o início dos eventos de divisão celular, a partir da cultura primária, que desenvolvem a formação de estruturas nodulares (Fig.4F – seta preta). Subsequentemente foi observado o desenvolvimento de culturas nodulares em forma de aglomerados nodulares e por análise histológica revelou que estas estruturas surgiram da zona meristemática e apresentam protoderme bem definida em seis semanas de cultivo em MSB com 0,01 de TDZ (Fig. 4G).

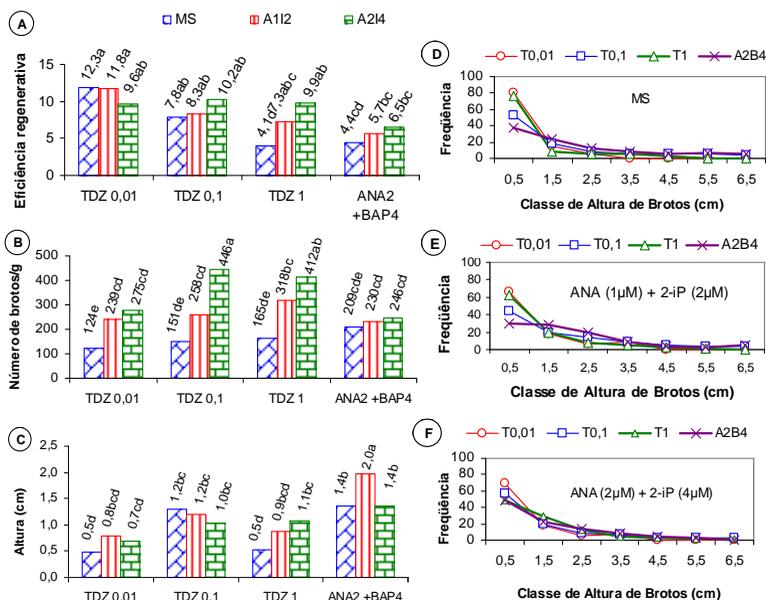


Figura 3. A) Eficiência regenerativa das culturas nodulares (CNs) de *Billbergia zebrina* B) Número médio de brotos regenerados por grama; C) Altura (cm) dos brotos e; D-F) frequência por classe de altura de brotos em relação ao subcultivo em meio de cultura MS isento de fitoreguladores (MS); A1I2 = MS + ANA (1 µM) + 2-iP (2 µM) e A2I4 = MS + ANA (2 µM) + 2-iP (4 µM) em relação os tratamentos de origem: MS suplementado com TDZ (0,001; 0,01 e 1 µM) e a combinação de ANA (2 µM) e BAP (4 µM), após 14 semanas de cultivo. * Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Eficiência regenerativa = (Peso final – Peso inicial)/Peso inicial. CV% = A)¹7.9; B) ²10.0; C) ²6.5. Dados transformados em ¹ = log (x+2) e ² = (x+0,5)^{0,5}.

Em secção longitudinal observou-se que o início da regeneração de microbrotos ocorreu após 8 semanas e destacou-se pela formação do meristema caulinar e primórdios foliares alongados (Fig.4H– setas). Este evento também foi visualizado por análise morfológica quando as culturas foram cultivadas MSB suplementado com 0,1 µM de TDZ e subcultivadas em 2 µM de ANA e 4 µM de 2-iP (Fig. 1H). Em imagens em MEV pode-se observar também o desenvolvimento de CNs primárias em proliferação a partir do segmento nodal com a formação e incremento de tamanho das estruturas pré-nodulares quando induzidas em MSB com 0,1 µM de TDZ e subcultivadas por 6 semanas em MSB (Fig. 4I). Por outro lado, em resposta ao cultivo com 1 µM de TDZ observou-se a formação de CN compacta, com superfície da cultura lisa (Fig. 4J).

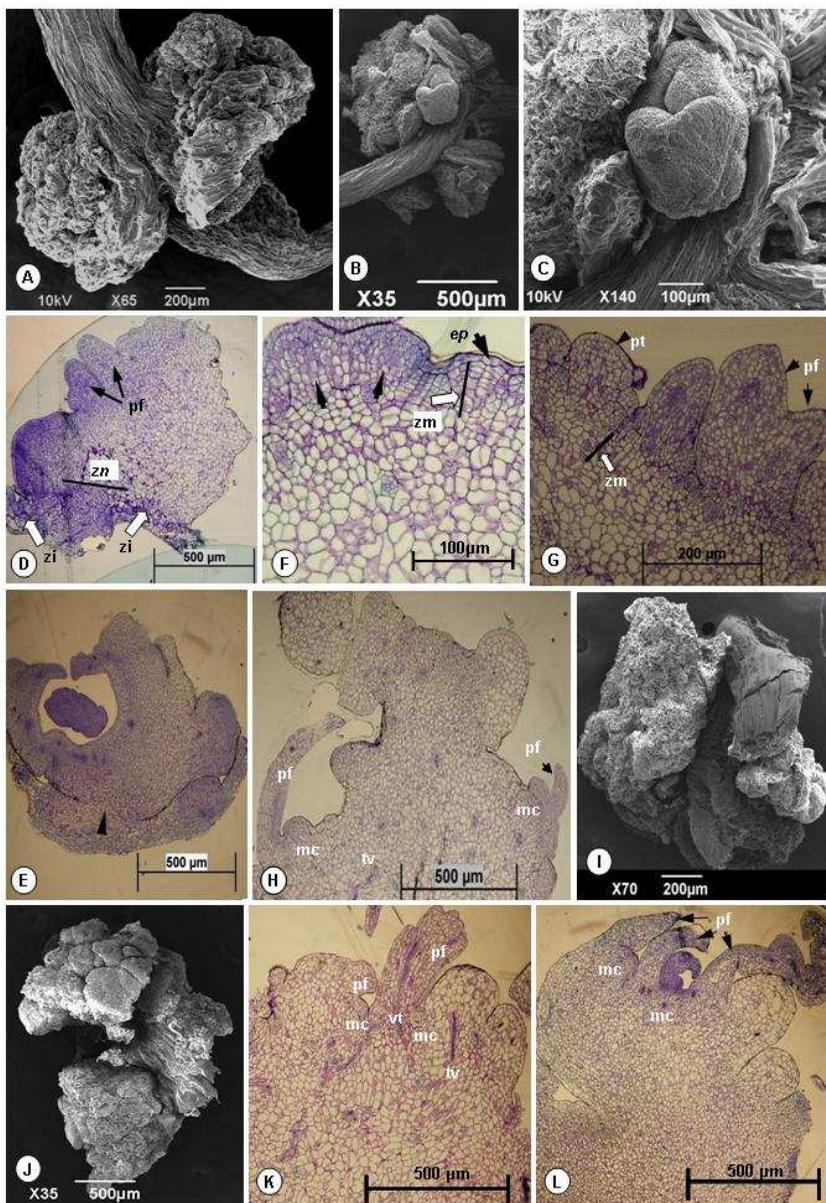


Figura 4. Estrutura e análise histológica de culturas nodulares (CNs) de *Billbergia zebrina*: **A-C)** Imagens em MEV mostrando: **A)** Indução e desenvolvimento de CN a partir da região da gema do segmento nodal, cinco semanas de cultivo; **B)** Segmento nodal com CN em proliferação com indução de gemas após 6-7 semanas; **C)** Detalhe da indução doma apical; **D)** Secção histológica longitudinal de segmento nodal com início da proliferação de CN a partir da região da gema; **E)** Secção transversal da região da gema, centro proliferação das células (detalhe); **F)** Detalhe da zona meristemática (seta) com início da formação dos nódulos, cinco semanas de cultivo; **G)** Indução de aglomerados de nódulos após 6 semanas em MSB com 0,01 de TDZ; **H)** início da regeneração de microbrotos com a formação de primórdios foliares (setas); **I)** CN em proliferação induzidas em BM com 0.1 μ M de TDZ em oito semanas de cultivo (MEV); **J)** Indução de CN compacta em BM com 1 μ M de TDZ; **K)** Seção histológica de CN em proliferação com a indução de gemas múltiplas com 0.1 μ M de TDZ; **L)** Regeneração de brotos em BM com 1 μ M de TDZ em oito semanas de cultivo. **Abreviaturas:** *mc* - meristema caulinar; *ep*-epiderme; *pf*- primórdio foliar; *zm*- zona meristemática, *zi*- zona internodal; *nz*- zona nodal; *pt*-protoderme; *tv*- tecido vascular.

Em secção longitudinal pode-se observar a formação de nódulos e o desenvolvimento de meristemas caulinares múltiplos com primórdios foliares, nos quais, detectou-se o estabelecimento de conexões vasculares nos primórdios foliares originados a partir do tecido nodular (Fig. 4K). Após oito semanas de cultivo em MSB com 1 μ M de TDZ foram identificadas gemas adventícias e a regeneração de brotos a partir de CN, destacados pelo alongamento de forma precocemente das folhas (Fig. 4L).

Análise de Genética Molecular – A genotipagem por eletroforese em capilares de MegaBACE 1000 e de acordo com a determinação dos parâmetros quanto aos tamanhos de fragmentos utilizando o software Fragment Profiler, permitiu a separação com confiança de um total de 337 fragmentos de AFLP. A planta matriz Bz1, mantida no bromeliário e não utilizada como fonte de explante, revelou baixa similaridade com as outras plantas adultas (Bz2 e Bz3), que estão em condições epifíticas em árvores no CCA/UFSC, bem como, com as culturas regeneradas (Fig. 5).

A análise de ordenação revelou outras dez plantas regeneradas além da plantas matriz Bz1 (Fig. 5A). Todas as outras plantas revelaram alta similaridade, área aglomerada do gráfico, quando comparadas com as plantas adultas Bz2 e Bz3 e entre todas outras plantas regeneradas (Fig. 5B). O fenograma UPGA demonstrou o grau de semelhança entre as plantas, que foi de 88 % entre as plantas B2.3 e B6.3, ambos originadas de 0,01 μ M de TDZ. A semelhança mais baixa foi revelada pela plantas B3.2 (do tratamento 0,1 μ M de TDZ), com somente 22 %

da semelhança com as outras plantas do grupo (Fig. 5C). Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, as plantas aglomerados (ver Fig. 5A) apresentou cerca de 60% de similaridade genética e mais duas plantas relacionadas têm 88% de similaridade (Fig. 5C).

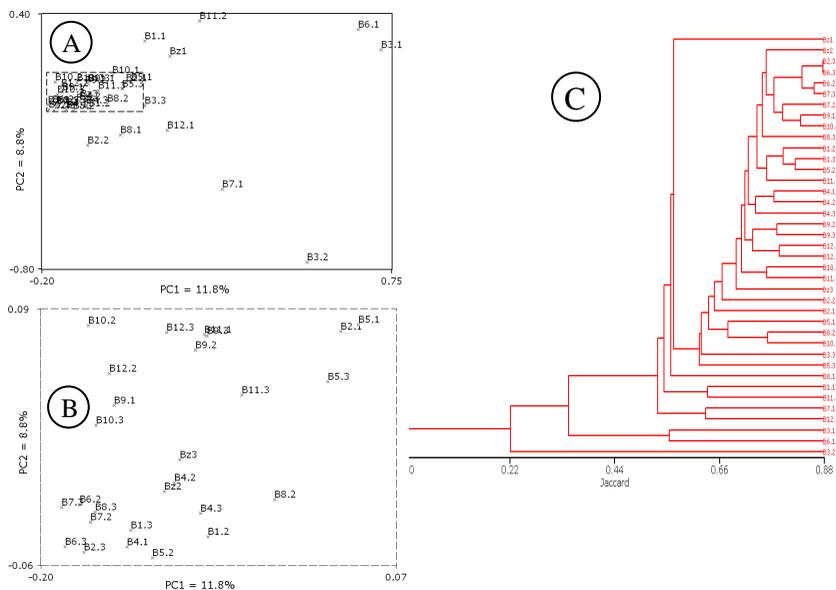


Figura 5. Ordenação e análises de três grupos de plantas adultas e de 36 amostras regeneradas a partir de CN: A) Análise coordenada principal de todas as plantas. B) Detalhe das plantas marcadas pela linha tracejada em A. C) Dendrograma UPGMA das 39 plantas, baseadas no índice de semelhança de Jaccard.

DISCUSSÃO

Segmentos nodais de brotos estiolados de *B. zebrina* cultivados em MSB com diferentes níveis de TDZ, iniciaram um programa específico de desenvolvimento da morfogênese. Este sistema apresentou alta competência e determinação para a formação de aglomerados de pequenos nódulos. O subcultivo destas culturas para meios de cultura contendo diferentes níveis e tipos de fitorreguladores resultou na para a formação de aglomerados nodulares que, neste trabalho, foram caracterizadas como culturas nodulares (CNs). A indução de CN morfologicamente variáveis com característica friável ou compacta com diferentes colorações, todas apresentaram alto potencial regenerativo. Além disto, em todos os níveis de fitorreguladores utilizados, observou-

se a formação de CNs competentes que evoluíram para a formação de brotos adventícios.

Forte et al. (2002) observaram que, anteriormente a formação dos nódulos ocorria à deposição de caloses sobre os entrenós de *Humulus lupulus* var. Nugget. Segundo estes autores, este evento iniciou com o intumescimento do tecido dos entrenós, resultando na formação de nódulos deonominados organogênicos.

A competência dos tecidos vegetais, como os utilizados neste trabalho, está relacionada com a habilidade das células competentes em reconhecer aos sinais externos indutivos, tal como as fontes exógenas de fitorreguladores utilizadas nos meios de cultura (Hicks, 1994). Por sua vez, a determinação está relacionada ao caminho de diferenciação capaz de formar, por exemplo, brotos adventícios, na organogênese ou, embriões somáticos na embriogênese (Gahan & George, 2008).

No presente trabalho, observou-se que a manutenção das CNs em processo repetitivo de multiplicação foi favorecida quando as CNs foram induzidas em MSB com 0,01 μM de TDZ. Contudo, o aumento nos níveis de TDZ nos meios de cultura de indução requer um aumento nas concentrações de ANA e 2-iP nos meios de subcultivo. Este fator incrementou, significativamente, a eficiência regenerativa e a frequência de regeneração de brotos, quando foi utilizado na indução concentrações de 0,1 ou 1 μM de TDZ.

O thidiazuron (TDZ) é um fitorregulador que apresenta ação semelhante às citocininas sendo é amplamente utilizado para o controle da morfogênese *in vitro* de muitas espécies. O uso de TDZ em meio de cultura em níveis mais reduzidos estimula a produção de um maior número de gemas ou brotos adventícios e, também, promove a proliferação de brotos a partir de gemas axilares e várias espécies (Lu, 1993). O potencial de indução da morfogênese com o uso de TDZ, como comprovam os resultados do neste trabalho, tem sido relatado também em várias outras espécies e tipos de explantes. O uso de 1,36 μM de TDZ e o subcultivo em 1,33 μM de BAP mais 0,49 μM de AIB, promoveu maior porcentagem de formação e alongamento de brotos a partir de explantes foliares de *Nothapodytes foetida* (Thengane et al., 2001). O uso de 4,5 μM de TDZ combinado ou não com 4,4 μM de BAP no cultivo de embriões de cereais de inverno (aveia, trigo, cevada e triticale), produziu elevado número de brotos por explante (Ganeshan et al., 2006). A combinação de 11,35 μM TDZ e 4,54 μM de zeatina, resultou em 100% de indução e maior produção de brotos adventícios por explante a partir de entrenós de *Mentha x piperita* (Wang et al., 2009).

Em bromeliáceas, a indução de estruturas morfogênicas, caracterizadas como CN apresenta alto potencial regenerativo de brotos adventícios, podendo ser utilizada para a produção de plantas em grande escala. Em espécies do gênero *Vriesea*, bromélias endêmicas da Mata Atlântica do Brasil ocorrem um padrão comum de desenvolvimento destas estruturas regenerativas, tal como observado em *V. fosteriana* (Mercier & Kerbauy, 1997), *V. friburgensis* var. *paludosa* (Alves & Guerra, 2001) e em *V. reitzii* (Rech Filho et al., 2005; Alves et al., 2006; Rech Filho et al., 2009). Para outras espécies de bromélias estes padrões regenerativos foram também observados em *Cryptanthus sinuosus* (Carneiro et al., 1998) e *Dyckia distachia* (Pompelli & Guerra, 2004). Em *Aechmea bromelifolia*, Aranda-Peres & Rodriguez (2006) obtiveram a indução de calos com o uso de 10 μM de TDZ mais 1 μM de ANA, quando os explantes foliares foram mantidos por 15 dias no escuro. Além disto, em *V. splendens* a multiplicação de culturas nodulares em forma de “clusters” é favorecida com o uso de MSB com 0,1 μM de TDZ e em *V. fosteriana* podem ser obtidas taxas de multiplicação de brotos de 14:1 quando utilizados este mesmo nível de TDZ (Guerra & Dal Vesco, 2010).

Na fase de indução, do presente trabalho, a maior frequência de formação de brotos, da classe de menor de altura (0,5cm) ocorreu em resposta ao uso de 1,0 μM de TDZ. Já, na fase de estabelecimento das culturas, a maior frequência de brotos de menor tamanho está relacionada ao uso de 0,01 μM de TDZ (Fig. 3D-F). Para estes tipos de CN e o pequeno tamanho de brotos observados neste trabalho revelam um alto potencial para os estudos de criopreservação *in vitro* e se enquadram adequadamente na tecnologia de unidades encapsuláveis proposta para bromélias por Guerra & Dal Vesco (2010). Quando comparadas às taxas regenerativas, os resultados deste trabalho são efetivamente superiores aos relatados em outras espécies. Como por exemplo, a indução em meio de cultura MS suplementado com 0,01 μM de TDZ e posterior subcultivo, para a regeneração, em meio MS isento de fitorreguladores podem ser obtidas, em 23 semanas de cultivos, em média 12,3g de novas culturas para cada grama de CN inoculada (Fig. 3A). A partir disto, permite-nos inferir que a indução de CN nesta espécie apresenta grande potencial regenerativo para produção de brotos em grande escala.

Neste contexto, e por estimativas, pode-se inferir, a partir do resultados obtidos no presente trabalho que quando se associa uma eficiência regenerativa de 10,2 vezes no incremento médio de peso

fresco em resposta ao cultivo em meio MSB suplementado com 0,1 μ M de TDZ (Fig. 3A) e a produção de 446 novos brotos/g de CN com o subcultivo em MSB com 2 μ M de ANA e 4 μ M de 2-iP (Fig. 3B) podem ser obtidos 4.500 novos brotos regenerados em 28 semanas de cultivo. Estas taxas regenerativas, portanto, são efetivamente superiores as observadas em outras bromeliáceas. Em *Ananas comosus*, a regeneração de brotos a partir de CNs cultivadas em meio MS suplementado com 0,54 μ M de ANA e 0,44 μ M de BAP, resultou em mais de 128 novos brotos por grama de inoculo (Teng, 1997). O uso de brotos estiolados, também em *A. comosus*, resultou em taxas regenerativas de 13 e 15 brotos por segmento nodal (Kiss et al., 1995). Em *Neoregelia cruenta* observou-se a taxa de regeneração foi de 21,7 brotos por explantes (Carneiro et al., 1999). Em *V. reitzii* estimou-se a produção de 60 novos brotos por grama de cultura nodular (Alves et al., 2006). Nesta mesma espécie, Rech Filho et al. (2009) estimaram taxas regenerativas de 39 brotos para cada 0,03g de cultura.i

Em outras espécies foram relatados sistemas regenerativos similares ao descrito no presente trabalho. Nódulos organogênicos, em foram obtidos a partir de segmentos de pecíolos de *Humulus lupulus* var. Eroica (Batista et al., 2000) e a partir de segmentos de entrenós da var. Nugget (Fortes & Pais, 2000). Calos nodulares a partir de segmentos foliares de *Decalepis hamiltonii* resultaram na formação de embriões somáticos ou da regeneração de brotos adventícios dependendo da combinação e da concentração dos fitorreguladores utilizada no meio de cultura (Giridhar et al., 2004). Nódulos organogênicos, brancos e compactos, induzidos a partir de segmentação das foliares de *Populus euphratica* resultaram na regeneração de brotos adventícios em meio MS suplementado de ANA e BAP (Ferreira et al., 2009).

Análises em MEV e Histológica - A formação de calo observada somente na região da gema axilar do segmento nodal de *B. zebrina* revelou ser essa uma região de convergência e alta vascularização. Estes aspectos podem estar associados a uma maior competência celular quando se compara com a região dos entrenós. O desenvolvimento e progressão deste processo da morfogênese foram monitorados por meio de análises histológicas. Estas observações revelaram que a indução de CN ocorreu a partir de divisões celulares na região subepidermica, denominada de zona meristemática. Nesta rota morfogenética observou-se a formação de estruturas pré-nodulares que evoluíram para a formação de meristemas caulinares. Estas características específicas

podem ser comparadas à análise morfológica da formação de múltiplas regiões meristemáticas (Fig. 1F) com primórdios foliares alongados (Fig. 1H) e a formação de múltiplos brotos (Fig. 1I) pode ser observada quando as CNs foram induzidas com a suplementação de 0,01; 0,1 e 1 μ M de TDZ, respectivamente.

Estudos histológicos a partir de folhas de *Cichorium intybus*, mostram que a iniciação das CNs ocorreu a partir de células competentes dos feixes vasculares (Piéron et al., 1998). A partir de segmentos pecíolo de *H. lupulus* observou-se que na indução de nódulos organogênicos, a seqüência de desenvolvimento levou à formação de nódulos a partir de centros organizados de cinco camadas de células meristemáticas da área central de vascularização (Batista et al. 2000). Nesta mesma espécie, Forte & Pais (2000), por meio de análises de imagens em MEV e histológicas, observaram que a partir das divisões de células da epiderme e da subepiderme dos entrenós ocorria a formação de nódulos organogênicos e a regeneração múltipla de novas gemas. Também em *H. lupulus* a análise por MEV revelou que o processo morfogenético da formação dos pré-nódulos, nódulos e a regeneração de gemas ocorreram a partir de uma pequena camada de calose na região de incisões dos entrenós (Forte et al., 2002). Segundo estes autores, esta camada de calose pode prevenir a perda de água e deste modo influenciar na capacidade de regeneração dos pré-nódulos.

Na bromélia *Tillandsia eizii* por meio de análise de secções histológicas detectaram-se atividades mitóticas nas camadas subepidérmicas que se organizam em regiões meristemáticas globulares e as análises de imagens em MEV confirmaram esta origem bem como o desenvolvimento de gemas (Pickens et al., 2006). A diferenciação de nódulos organogênicos a partir de explantes foliares em *Populus euphratica* inicia a partir da divisão das células do câmbio, onde ocorre à formação de centros organizados, seguidos da regeneração dos primórdios e a organização de meristemas caulinares (Ferreira et al., 2009).

Análise genética e conservação – A origem das plântulas regeneradas neste estudo não foi necessariamente de uma planta-mãe em particular, mas de uma mistura de plântulas de diferentes recombinações. Portanto, não se justifica realizar uma análise da variação somaclonal. Considerando que as amostras analisadas neste estudo foram culturas regeneradas a partir uma mistura de sementes, incluindo as repetições de cada tratamento, não é esperada alta similaridade entre elas. Por outro lado, culturas *in vitro* que utilizam fitorreguladores podem gerar variação somaclonal, revelando, portanto

que, os clones regenerados não são geneticamente iguais devido à ocorrência de algum tipo de variação. No entanto, a variabilidade por recombinação, por mutações induzidas ou naturais é uma fonte importante da diversidade necessária nos programas de conservação e melhoramento de plantas. Assim, as variantes somaclonais geradas podem ser úteis em um programa de avaliação e seleção, resultando, por exemplo, no desenvolvimento de novas cultivares. Chen et al. (2006), também utilizaram marcadores AFLP para analisar a diversidade genética e selecionar os variantes somaclonais das cultivares de *Syngonium podophyllum*. Estes autores concluíram que as cultivares desta espécie atualmente cultivadas são geneticamente muito semelhantes. Portanto, é necessário aumentar a diversidade genética para prevenir doença e/ou potenciais epidemias fitossanitárias. Análises de genética molecular, tal como utilizada em *B. zebrina* podem ser utilizadas em diagnósticos, objetivando a redução de perdas econômicas e comerciais, tal como ocorre na produção de mudas em sistemas biofábricas. Além disso, análise de genética molecular pode acelerar o processo de seleção em programas de melhoramento genético. Por exemplo, neste estudo, a análise de AFLP sugeriu a ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas. Apesar disso, as plântulas aclimatizadas revelaram fenótipo normal (Fig. 1M). Isto significa que, as variações ou mutações podem ser expressas nas novas fases de desenvolvimento da planta ou em outros órgãos, como na inflorescência. Tais mutações podem apresentar importância econômica desde que, por exemplo, a *B. zebrina* seja comercializada como planta ornamental.

Mutações de origem induzidas ou naturais são importantes e necessárias para a manutenção da diversidade genética em programas de conservação e de melhoramento de plantas. Assim, os variantes somaclonais podem ser avaliados e selecionados, resultando no desenvolvimento de novas cultivares. Estes resultados mostraram também que, a integração entre cultura de tecidos e análises genéticas pode ser uma ferramenta robusta para o planejamento de estratégias de conservação (Stefenon & Welter, 2009; Stefenon et al., 2009). Apesar de o marcador AFLP estar sendo amplamente utilizado em estudos de diversidade genética em diferentes espécies de plantas, este é de acordo o levantamento atual das literaturas, o primeiro estudo utilizando marcadores AFLP em *B. zebrina*. Esta espécie é considerada ameaçada de extinção no bioma Mata Atlântica no Estado do Rio Grande do Sul. A reprodutibilidade e o elevado nível de polimorfismo detectado nos fragmentos distribuídos no genoma fazem da técnica de AFLP uma

poderosa ferramenta para a análise da diversidade genética visando conservação genética *in situ* ou *ex situ*.

Os resultados da análise genética molecular realizada neste estudo não são conclusivos sobre a fidelidade clonal do protocolo de propagação, por apresentar um elevado polimorfismo dos marcadores AFLP. Além disto, a *B. zebrina* apresenta potencial para estudos de diversidade genética por não ser genótipo específico. Estes resultados permitem inferir que o presente sistema regenerativo pode ser utilizado para manter o nível de diversidade genética das culturas regenerada. No entanto, se nas próximas fases de desenvolvimento, não houver variação fenotípica a ser expressa, isso significa que a ocorrência de diversidade observada refere-se a amplificação de regiões não codificantes, ou variação transientes ou ainda epigenéticas que também são abrangidas por marcadores AFLP.

Conclusão - O sistema regenerativo *in vitro* baseado na indução, proliferação e desenvolvimento de CN de *B. zebrina* é o primeiro realizado com esta espécie de bromeliácea. O uso deste sistema possibilitou a manutenção das culturas com baixo nível de diferenciação por longo tempo. Este sistema apresenta também alto potencial para servir como modelo de estudo de desenvolvimento e regeneração dos brotos, associados à histodiferenciação, a conservação *in vitro* e/ou a criopreservação da espécie. Foram identificadas e caracterizadas também que, as diferenças morfológicas das culturas nodulares estão associadas, especificamente, a cada concentração e combinação de fitoregulador utilizado no meio de cultura. Este padrão da morfogênese *in vitro*, para a *B. zebrina*, pode também ser explorado com sucesso para a propagação em grande escala, devido à alta taxa regenerativa de brotos. Além disto, pode ser mantido o controle de todas as etapas da micropropagação, até o estabelecimento das mudas em ambiente *in vivo*. Este protocolo pode ser comparável as demais espécies de bromélias ornamentais. Além disto, esta espécie apresenta grande potencial ornamental e de conservação, pela exuberância das suas inflorescências (Fig. 1A) e, principalmente, pela importância ecológica que exerce as bromeliáceas dentro do bioma Mata Atlântica. A integração do sistema de regeneração *in vitro*, apresentada aqui com a análise da genética molecular usando a técnica de AFLP é uma alternativa atraente. A reprodutibilidade, o elevado nível de polimorfismo detectado e a grande quantidade de fragmentos do genoma fazem desta técnica AFLP uma poderosa ferramenta de análise da diversidade genética visando à conservação *in situ* e *ex situ*. Embora os resultados da análise genética molecular, pelo marcador AFLP, realizada neste trabalho, não são

conclusivos sobre a fidelidade clonal do protocolo de propagação, por demonstrar elevado polimorfismo, pode ser importante, portanto, para estudos de diversidade genética da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, G.M. & Guerra, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **J. Bromeliad Soc.**, v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- Alves, G.M.; Dal Vesco, L. L. & Guerra, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.**, v.110, p.204–207, 2006.
- Aranda-Peres, A.N.; Rodriguez, A.P.M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). **Flor. ornam. plant biotech.**, 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006, v.4, pp. 644-655.
- Barros, J. V. de, Costa, A. F da. O gênero *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 22, n. 4, p. 1172-1192, 2008.
- Batista, D., Ascensão L., Sousa, M. J., Pais, M. S. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Sci.**, Shannon, v.151, p. 47–57, 2000.
- Benzing, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation.** Cambridge Univ. Press, Cambridge. 2000.
- Carneiro LA, Cândido MSD, Araujo RFG, Fonseca MHPB, Crocomo OJ, Mansur E Clonal propagation of *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith, an endemic stoloniferous Bromeliaceae species from Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Tis Cult Biotech.**, v.4, p.153-158, 1998.
- Carneiro, L.A., Araujo, R.F.G., Brito, G.J.M.; Fonseca, M.H.P.B., Costa, A.; Crocomo, O.J.; Mansur, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 55, p. 79-83, 1999.
- Chen J., Henny R.J., Devanand P.S., Chao C.T. AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. **Plant Cell Rep.**, v.24, p.743-749, 2006.
- Chuang S.J., Chen, C.L., Chen, J.J., Chou, W.Y., Sung, J.M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Hort.**, v.120, p.121-126, 2009.
- Compton, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.37, p.217-242, 1994.
- Ferreira, S.; Batista, D. Serrazina, S. Pais, M. S. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 96, p.35–43, 2009.
- Fortes AM, Pais MS An electron probe X-ray microanalysis study during organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget. **Plant Sci** 160: 933–941, 2001.
- Fortes, A. M. & Pais, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content. **Am. J. Bot.**, v. 87, n. 7, p. 971–979, 2000.

- Fortes, A. M., Testillano, P. S. Risueño, M. Del C., Pais, M. S. Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. **Physiol. Plant.**, v. 116, p.113–120, 2002.
- Gahan, P.B. & George. E.F. **Adventitious Regeneration**. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3^a. Edição, , Dordrecht:Springer, pp.355-401, 2008.
- Ganeshan S, Chodaparambil S.V, Baga, M, Fowler, DB, Hucl P, Rossnagel BG, Chibbar RN. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. **Plant Cell Tis Org Cult.**, v.85, p.63-73, 2006.
- Giridhar, P.; Kumar, V.; Ravishankar, G. A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.40, p.567–571, 2004.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press-Springer, 2010. v.589, pp.47-66.
- Heywood, V. H. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 1140p.
- Hicks, G. H. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. **In Vitro Cell Dev. -Biol.-Plant.**, v. 30P, p.10-15; 1994.
- Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G., Heszky, L.E., A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortSci.**, v.30, n1,p. 127-129, 1995.
- Koh, Y.C.; Davies Jr, F.T. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horti.**, v.70, p. 301-307, 1997.
- Lu, C.-Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** v.29, p.92-96, 1993.
- Luther, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 2008. 114p.
- Martinelli, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific Am.**, v. 282, p. 86-93, 2000.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.-C., Karp, A. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. **Theor. Applied Genet.**, v.102, p.971–979, 2001.
- Mercier H, Kerbauy GB Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj YPS (ed), **Biotechnology in Agriculture and Forestry.**, vol.40. Springer-Verlag, Berlin, 1997, pp 43-57.
- Mercier, H.; Kerbauy, G.B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from atlantic rain forest canopy. **Selbyana**, v.16, n.2, p.147-149, 1995.
- Meudt, H.M.& Clarke, A.C. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Sci.**, v.12, n.3, p.106-117, 2007.

- Morel, G.M. & Wetmore, R.H. Tissue culture of monocotyledons **Am. J. Bot.**, 38:138-140, 1951.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497. 1962.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- Pickens, K.A.; Wolf, J.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.42, p.348-353, 2006.
- Piéron, S.; Boxus, P.; Dekegel, D Histological study of nodule morphogenesis from *Cichorium intybus* l. leaves cultivated *in vitro*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.34, p.87-93, 1998.
- Pompelli, M.F. Guerra, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breed. Applied Biotech.**, V.4, p.273-279, 2004.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L. Nodari, R.O. Lischka, R.W. Müller, C.V.; Guerra, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biod. Conserv.**, v. 14, p. 799-1808, 2005.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L.; Guerra, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.909-912, 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.
- Reitz, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues. 1983, 559p.
- Rohlf, F. J. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system ver. 2.0. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, 1998.
- RS Biodiversidade. Biodiversidade do RS: Espécies ameaçadas no Estado do Rio Grande do Sul. Decreto N° 42.099, de 31/12/2002. <http://www.biodiversidade.rs.gov.br/>. Acesso em: 20/05/2009.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. **Flora Neotropica**, Monograph n°14, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). New York: Hafner Press, p.1493-2142, 1979.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. **Biometry**. WH Freeman and Company, New York. 1995.
- Stefenon, V.M., Gailing, O., Finkeldey, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology**, v.9, p.516-525, 2007.
- Stefenon, V.M.; Nodari, R.O. Guerra, M.P. Genética e conservação de *Araucária angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, v.17, p. 47-63, 2004.
- Stefenon, V.M.; Steiner N.; Guerra M.P; Nodari, R.O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiv. Conserv.**, v.18, p.2433-2448, 2009.
- Stefenon, V.M.; Welter, L. J. Conservation of araucaria forest in Brazil: the role of genetics and biotechnology. In: Kudrow, N. J. (ed.) **Conserv. Natural Res.**, Nova Science Publishers. p. 137-152. 2009.

- Steinmacher, D. A.; Krohn, N.G.; Dantas, A.C.de M.; Stefenon, V.M.; Clement, C. R.; Guerra, M.P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Ann. Bot.**, v.100, p.699-709, 2007.
- Teng, W.L. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. **Plant Cell Rep.** v.16, p.454-457, 1997.
- Thengane, S. R.; Kulkarni, D. K.; Shrikhande, V. A.; Krishnamurthy, K. V. Effect of thidiazuron on adventitious shoot regeneration from seedling explants of *Nothapodytes foetida*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.37, p.206-210, 2001.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, P.J., Kuiper, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.
- Wang, X.; Gao, Z.; Wang, Y. Bressan R.A., Weller, S.C. e Li, X. Highly efficient in vitro adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.45, p.435-440, 2009. doi:10.1007/s11627-008-9170-x

6. CAPÍTULO 2

Indução de culturas nodulares e regeneração *in vitro* de microbrotos em *Vriesea reitzii* a partir de explantes foliares e sementes

Lirio Luiz Dal Vesco⁴, Miguel Pedro Guerra¹

RESUMO

A indução de culturas nodulares (CNs) e a subsequente regeneração de microbrotos em *V. reitzii* parecem se configurar em um sistema de alta performance regenerativa *in vitro* em bromélias. No presente trabalho foram estudados os fatores determinantes do controle da morfogênese *in vitro* destas culturas. Sementes excisadas de cápsulas maduras e segmentos foliares de brotos cultivados *in vitro* foram cultivados em meio MSB líquido ou geleificado e suplementado com diferentes tipos, concentrações e balanços de fitorreguladores e submetidos a diferentes condições de cultivo. CNs originadas de explantes de sementes foram subcultivadas em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de AIA e AG₃. Microbrotos resultantes das CNs originadas de explantes foliares foram subcultivados em meio de cultura líquido e geleificado. Os fitorreguladores suplementados ao meio MSB inibiram o a germinação das sementes e promoveram a indução de CN após 2 semanas em cultivo. CNs induzidas em meio suplementado com ANA (4 µM) e subcultivadas em meio MSB suplementado com ANA e 2-iP (2 µM cada) apresentaram textura granular e alta taxa de proliferação. O cultivo destas CNs em meio MSB suplementado com AIA (4 µM) resultou no maior número médio de microbrotos (1.468 brotos/g de CN). A partir do modelo de regressão foi possível inferir que o número máximo de brotos alongados (66,3 brotos) pode ser obtido com o subcultivo dos microbrotos em meio MSB suplementado com AIA (2 µM) e AG₃ (10 µM). Em todos os meios de cultura testados observou-se a formação de CN cuja indução ocorreu a partir da região basal do explante foliar, após 4 semanas em cultura. Estas CNs responderam de forma diferencial aos tratamentos em termos de características morfogênicas e potencial regenerativo. CNs mantidas na presença de luz resultaram em maior produção de massa fresca e de microbrotos em comparação com aquelas mantidas na ausência de luz. CNs

⁴ Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. E-mails: lirio@cca.ufsc.br; mpguerra@cca.ufsc.br

subcultivadas em meio MSB líquido e suplementado com ANA (4 μM) e 2-iP (2 μM) revelaram elevada eficiência regenerativa. Brotos maiores do que 3,0 cm resultaram em mais de 95% de sobrevivência *ex vitro*.

Palavras chaves: Bromeliáceas, micropropagação, Cultura nodular, microbrotos, taxa regenerativa, propagação clonal, conservação.

Abreviaturas: AIA - ácido indolil 3-acético; AIB – ácido indolil-3-butírico; ANA-ácidonaftalenoacético; BAP - 6-benzilaminopurina; CNs - Culturas nodulares; 2,4-D - 2,4-ácido diclorofenoxiacético; MSB – meio básico MS; 2-iP - N6 (2-isopentenil) adenina; MS – Murashige & Skoog (1962); TDZ- thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea).

ABSTRACT

Induction of nodular cultures and in vitro regeneration of microshoots of *Vriesea reitzii* from leaf and seed explants

The induction of nodular cultures (NCs) and the subsequent regeneration of microshoots in *V. reitzii* comprise a high performance system for the mass propagation in bromeliads. In the present work it was studied the factor determining the in vitro morphogenesis of this bromeliad. Seeds excised from mature capsules and leaf segments from in vitro grown shoots were cultivated in MSB liquid or gelled culture medium supplemented with different types, levels and balances of plant growth regulators (PGRs) and submitted to different culture conditions. NCs originated from seeds were subcultured to culture media with different levels of IAA and GA₃. Microshoots resulting from NCs of leaf explants were subcultured to liquid and gelled culture media. PGRs supplemented to MSB medium inhibited the germination of seeds and promoted the induction of NCs in culture medium supplemented with NAA (4 μM), then subcultured to MSB medium supplemented with NAA and 2-iP (2 μM each) presented friable texture and high proliferative capacity. The subculture of these NCs to MSB medium supplemented with IAA (4 μM) resulted in the highest number of microshoots (1, 468 /g of NCs). From the regression analysis it was possible to infer that the highest number of elongated shoots (66.3) can be obtained in response to the MSB medium supplemented with IAA (2 μM) and GA₃(10 μM). All the tested culture media allowed the induction of NCs arising from the basal region of the leaf explant after 4 weeks in culture. However these NCs showed differential responses to the different treatments in terms of morphogenetic features and regenerative potential. As compared to the absence of light NCs cultivated in the presence of light showed higher fresh mass yield and microshoot production. NCs subcultured to MSB medium

supplemented with NAA (4 μ M) and 2-iP (2 μ M) revealed high regenerative efficiency. Shoots longer than 3 cm showed more than 95% *ex vitro* survival rate.

Keywords: Bromelids, nodular cultures, microshoots, mass propagation.

Abbreviations: 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2-iP - 2-isopenteniladenine; BAP-6-benzylaminopurine; IAA- Indole-3-acetic acid IBA - Indole-3-Butyric acid NAA- α -naphthaleneacetic acid; NCS – nodular cultures; MSB – MS basal medium; 2-iP - N⁶ (2-isopentenyl) adenine; GA₃ – gibberellic acid; MS – Murashige and Skoog (1962); TDZ- thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea).

INTRODUÇÃO

A floresta tropical atlântica é um dos 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo, aliando endemismo e ameaça crítica (Myers et al., 2000; Metzger, 2009). A fragmentação deste bioma demonstra que o mesmo foi o que mais sofreu com perdas florestais (Ribeiro et al., 2009), decorrente do avanço dos maiores centros urbanos e rurais no país (Metzger, 2009). Este fator promoveu perdas gradativas de espécies arbóreas (Silva & Tabarelli, 2000), o que promoveu um efeito cascata na perda da biodiversidade numa amplitude incalculável (Lopes et al., 2009). Este cenário crítico de conservação deste bioma tem despertado na comunidade científica esforços para o entendimento das relações ecológicas entre as espécies, bem como, recomendações para a implementação de ações urgentes de conservação e restauração para mitigar essa situação (Lopes et al., 2009; Metzger, 2009; Ribeiro et al., 2009; Rodrigues et al., 2009).

As bromélias são componentes comuns a este bioma e pertencem a grupos taxonômicos de alta riqueza e diversidade genérica e específica (Martinelli et al., 2008). A ameaça que este grupo sofre deriva da fragmentação dos ecossistemas florestais e da extração ilegal da floresta decorrente do seu alto valor ornamental, paisagístico ou de interesse farmacológico (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006; Martinelli et al., 2008). Os microhabitats formados pelas bromélias contribuem para estabilidade deste ecossistema florestal e este subsistema ecológico complexo cria uma relação de interação entre as espécies que cohabitam ou delas são beneficiadas e cada uma contribui para a manutenção da diversidade em função das adaptações e especializações do ambiente (Benzing, 2000; Martinelli, 2000).

A família Bromeliaceae abrange 58 gêneros e 3.172 espécies e subespécies (Luther, 2008) e mais de 50% das espécies são epífitas (Martinelli, 2000). O gênero *Vriesea* da subfamília Tillandsioideae engloba 261 espécies e 44 variedades e formas (Luther, 2008),

distribuídas nas Américas desde o sul do Brasil e Norte da Argentina até o México e Cuba (Smith & Downs, 1977). No Estado de Santa Catarina, das 137 espécies ocorrentes, 31 são endêmicas (Reitz, 1983).

Vriesea reitzii Leme & Costa (Fig. 1A), pertence à subfamília Tillandsioideae (Bromeliaceae) é uma bromélia epífita nativa da floresta neotropical Atlântica e ocorre nos três Estados do Sul do Brasil. Adapta-se a temperaturas mais frias e se distribui em altitudes de 750 a 1200 m no domínio da Floresta Ombrófila Mista. Apresenta aspectos morfológicos que se diferenciam daqueles ocorrentes em *V. philippocuburgii* pelas lâminas de folhas verdes- amareladas, com linhas verdes transversais mais escuras e pelo fato de que esta última ocorre em regiões com altitudes de até 400m (Leme & Costa, 1991; Baensch & Baensch, 1994). A semelhança entre estas duas espécies é tanta que Reitz (1983) considerou uma única espécie. Além disto, *V. reitzii* é considerada como vulnerável porque seu habitat epifítico primário a *Araucaria angustifolia* tem suas populações naturais extremamente reduzidas (Klein, 1990; Leme & Costa, 1991).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais compreendem um conjunto de ferramentas aplicáveis à propagação em larga escala visando à captura e fixação de ganhos genéticos ou à conservação. No caso de bromélias foram reportados sistemas regenerativos *in vitro* baseados em padrões morfogenéticos associados à indução de CNs, as quais foram definidas como grupos ou aglomerados de nódulos organogênicos com alta competência regenerativa (George, 1993). A elevada competência deste sistema morfogenético *in vitro* culmina na produção múltipla de brotos adventícios em condições de cultura adequadas (Gahan & George, 2008).

Uma das estratégias para a indução de CN em bromélias se baseia no uso de bases foliares, como descrito para a regeneração de brotos adventícios em *Ananas comosus* (Teng, 1997; Firoozabady & Moy, 2004), e *V. reitzii* (Alves et al., 2006; Rech Filho et al., 2009). Esta técnica é uma ferramenta importante e pode ser empregada para a propagação em larga escala para as bromélias de interesse ornamental, bem como para a conservação *in vitro* de bromélias ameaçadas de extinção (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006; Guerra & Dal Vesco, 2010). Estas técnicas já vêm sendo aplicadas para várias espécies de bromélias nativas de Santa Catarina, tais como *V. friburgensis* var. *paludosa* (Alves & Guerra, 2001), *Dyckia distachia* (Pompelli & Guerra, 2004, Pompelli et al., 2005), *V. Reitzii* (Rech Filho et al., 2005, 2009 e Alves et al., 2006), *V. gigantea* e *V. philippocuburgii* (Droste et al., 2005).

No presente trabalho objetivou-se estabelecer um sistema de indução de culturas nodulares e regeneração dos microbrotos a partir de explantes foliares e de sementes de *V. reitzii*, cultivados em diferentes tipos e combinações de fitorreguladores e condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo - O meio de cultura básico utilizado foi composto pela formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), sacarose (30g L^{-1}), doravante denominado de meio MS básico (MSB), líquido ou geleificado com $7,5\text{g L}^{-1}$ de Agar-agar (Sigma[®]). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem por 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1,3 atm. Quando as culturas foram mantidas na presença de luz, as mesmas foram mantidas em sala de cultura com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de $50\text{-}60\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, por meio de luz fluorescente clara de lâmpadas Sylvana[®] (40-60 W).

Indução de CN a partir de explantes de Sementes

Indução - Sementes extraídas de cápsulas maduras foram excisadas de plantas matrizes de *V. reitzii* mantidas no Centro de Treinamento da Epagri de São Joaquim, S. Joaquim, SC, localizado a 1470m de altitude (Fig. 1A), foram utilizadas como fontes de explantes. O processo de desinfestação e as condições de incubação das culturas seguiram os procedimentos descritos por Alves et al. (2006).

O desenho experimental foi um esquema fatorial (4×2) com oito tratamentos: quatro meios de cultura: 1) MSB isento de fitorreguladores; 2) MSB + ANA ($4\text{ }\mu\text{M}$); 3) MSB + BAP ($4\text{ }\mu\text{M}$); 4) MSB + TDZ ($0,1\text{ }\mu\text{M}$), em combinação com duas condições de cultivo: 1) Em tubo de ensaio ($22 \times 150\text{ mm}$) contendo 15 ml de meio de cultura líquido, sobre ponte de papel filtro e; 2) Em frasco de vidro (340 ml) contendo 25 ml de meio de cultura geleificado. Cada unidade experimental foi constituída de 8 tubos de ensaios contendo 2-3 sementes/tubo e 3 frascos de vidro (340 ml) contendo 6-7 sementes, totalizando 20 ± 1 sementes por unidade experimental, arranjados em forma de BCC, com três repetições. Dados de porcentagem de indução de CN, e germinação foram coletados após seis semanas em cultivo.

Manutenção das CNs - Culturas nodulares e microbrotos regenerados foram subcultivados em meio MSB isento de fitorreguladores e suplementado com $2\text{ }\mu\text{M}$ de ANA e de 2-iP. Para a manutenção das culturas foram utilizados meios gelificados em tubo de ensaio e em frascos de vidro (340 ml), contendo 15 ml e 25 ml de meio

de cultura, respectivamente. O registro dos dados foi através de fotomicrografia e coletados ao longo do período de manutenção das culturas por mais de 2,5 anos.

Regeneração de microbrotos - CNs e culturas de microbrotos mantidos em meio de cultura MSB foram empregadas como fontes de explantes para avaliar a eficiência regenerativa de diferentes combinações de fitoreguladores. Foi testada a suplementação ao meio MSB com cinco diferentes combinações de fitoreguladores: 1) MSB isento de fitoreguladores; 2) AIA (4 μM); 3) AIA (4 μM) e AG₃ - ácido giberélico (4 μM); 4) AG₃ (4 μM) e; 5) ANA (1 μM) e BAP (2 μM). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaios (22x150mm) contendo 15 ml de meio de cultura líquido e inoculados com 0,27g \pm 0,004g de massa fresca de CN por tubo, sobre ponte de papel filtro, com quatro repetições em um delineamento experimental em forma de BCC. Dados de massa fresca (g) das culturas nodulares e número de microbrotos regenerados foram coletados após nove semanas de cultivo.

Alongamento - CN proveniente do meio de cultura MSB foram empregadas como fonte de explantes. O delineamento experimental constou de um esquema bifatorial (4x3) com 12 tratamentos: quatro concentrações de AIA (0, 4, 8 e 12 μM) em combinação com três de AG₃ (0, 5 e 10 μM) suplementados ao meio de cultura MSB. Cada unidade experimental foi constituída de três frascos de vidro contendo 18 ml de meio de cultura líquido. Cada frasco foi inoculado com 2,0g \pm 0,04g de massa fresca de CN e, dispostos em BCC e três repetições. Dados de número de brotos alongados por classe de altura de brotos e a massa fresca (g) das culturas não alongadas foram coletados após 20 semanas de cultivo.

Indução de CN a partir de explantes foliares

Indução de CN - Segmentos de bases foliares (0,4- 0,6 mm), excisados a partir de brotos jovens (1,5-2,5 cm) de *V. reitzii* foram cultivados em frascos de vidro (340 ml) contendo 25 ml do meio de cultura MSB líquido foram utilizados como explantes. Empregou-se um delineamento experimental fatorial (8x2) com 16 tratamentos: oito meios de cultura MSB suplementados com 20 μM de: 1) 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético); 2) ANA (ácido α -naftalenoacético); 3) AIB (ácido indol-3-butírico), e; 4) AIA - (ácido indol-3-acético), combinados com 2 μM de 2-iP [N⁶(2-isopentenil) adenina]; 5) 1 μM de TDZ (thidiazuron) + 2 μM de 2-iP; 6) ANA (4 μM) + 2-iP (2 μM); 7) ANA (4 μM) + 2 μM de BAP (6-benzilaminopurina) e 8) ANA (2 μM) + BAP (4 μM). A estes tratamentos foram associadas duas condições de

cultivo: 1) ausência e; 2) presença de luz. Cada unidade experimental foi constituída de 5 tubos de ensaios (22 x 150 mm) contendo 2-3 explantes inoculados em tubos de ensaio sobre ponte de papel filtro, contendo 15 ml de meio de cultura, em forma de blocos completos casualizados (BCC), com três repetições.

Estabelecimento das CNs - As culturas provenientes do ensaio de indução foram mantidas nos mesmos meios de cultura e ambiente de cultivos utilizados na indução. Após 13 semanas em cultivo foram coletados dados de massa fresca (g) das CNs, número de microbrotos regenerados e comprimento dos microbrotos. Após 18 semanas em cultivo, as culturas mantidas na ausência de luz foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas de luz.

Multiplificação - CN e microbrotos regenerados no meio de estabelecimento foram subcultivadas após 22 semanas para frascos de vidro (340 ml) contendo 20 ml de meio MSB, isento de fitorreguladores. O delineamento experimental constou de um esquema fatorial com 16 tratamentos (8x2): os oito meios de cultura utilizados no ensaio de indução, combinados com duas consistências do meio de cultura: 1) líquido e; 2) geleificado com Agar-agar Sigma[®] (7,5g L⁻¹). Utilizou-se um delineamento de BCC com três repetições e cada unidade experimental foi constituída de três frascos contendo três aglomerados de CN, o que correspondeu, em média, a 0,38 ±0,08g de CN por frasco. Dados de eficiência regenerativa, calculado a partir da massa fresca inicial e final, de acordo com a fórmula: [Eficiência = (massa fresca final – massa fresca inicial)/ massa fresca inicial] e dados de número médio de brotos regenerados e altura média (cm) dos brotos foram coletados após 13 semanas de cultivo em frascos de 340 ml.

Aclimatização - Brotos alongados e com mais de 3,0 cm de altura foram transferidos para substratos compostos por uma mistura de casca composta de Pinus, casca de arroz carbonizada e o substrato comercial Plantmax[®] (2:2:1 v/v) sobre bandejas de isopor com 128 células. As mudas foram mantidas em túnel de nebulização com irrigação intermitente. Dados de porcentagem de sobrevivência foram coletados após 5 semanas e após 15 semanas nas condições *in vivo* as plântulas foram transplantadas para vasos de 350 ml utilizando o mesmo substrato.

Análise Estatística - Os dados coletados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias. Quando necessário os dados originais foram transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou em $\log(x+1)$ segundo as recomendações de Steel & Torrie (1980) e Compton (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de CN a partir de sementes

Indução - Sementes de *V. reitzii* cultivadas em meio de cultura MSB suplementado com os diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores foram induzidas à formação de CN, com coloração verde amarelada, após duas semanas em cultivo (Fig. 1B). Por sua vez, sementes cultivadas em meio MSB isentos de fitorreguladores germinaram e formaram plântulas (Fig. 1C). A inibição da germinação normal das sementes e a proliferação de calos e indução de gemas adventícias foram também observadas a partir de sementes de *Tillandsia eizii* (Pickens et al., 2006). Assim, este tipo de explantes é constituído por células competentes capazes de reconhecer aos sinais indutivos (Hicks, 1994) e podem ser redirecionados para novas rotas regenerativas (Gahan & George, 2008).

As maiores e significativas ($p < 0,001$) porcentagens de indução de CN resultaram do cultivo em meio MSB líquido suplementado com 4 μM de ANA (81,8%) e com 0,1 μM de TDZ (80,9%), após seis semanas em tubos de ensaio, sobre ponte de papel filtro (Fig. 2). No entanto, foram observadas diferentes características morfológicas associadas aos diferentes fitorreguladores utilizados (Fig. 1D-G). Assim, quando as CNs foram induzidas a partir de meios de cultura suplementados com ANA, elas apresentavam textura granular e alta capacidade de proliferação (Fig. 1D), quando comparado às culturas mais compactas que se originaram em MSB suplementado com TDZ (Fig. 1E), e que evoluíram para a formação de CN (Fig. 1F). Por sua vez meios de cultura suplementados 4 μM de BAP promoveram a indução simultânea de CN e de microbrotos (Fig. 1G).

Estruturas nodulares globulares obtidas a partir de tecido foliar de *Ananas comosus* foram induzidas em meios de cultura suplementados com TDZ e AIB (Firoozabady & Moy, 2004). Em *Tillandsia eizii* a maior porcentagem de indução de gemas e o maior número de gemas/explantes ocorreram em resposta ao meio de cultura suplementado com BAP e ANA (Pickens et al., 2006). O uso de TDZ e ANA também induziu a formação de calos a partir de explantes foliares de *Aechmea bromelifolia* (Aranda-Peres & Rodriguez, 2006).

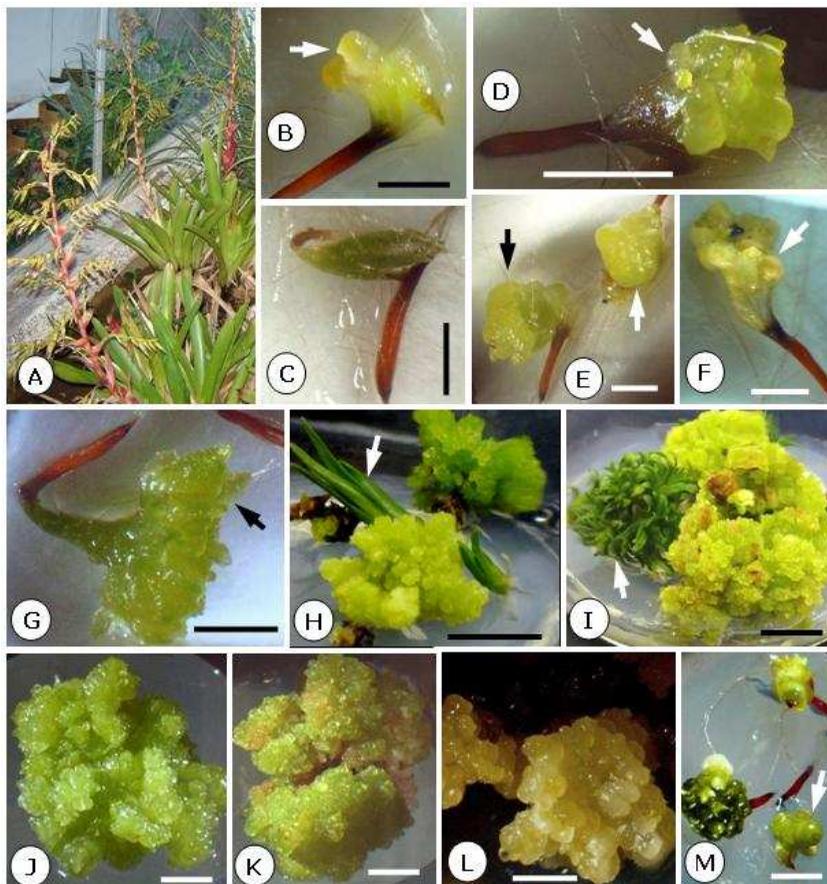


Figura 1. Indução e caracterização morfológica das CNs obtidas a partir de sementes de *V. reitzii*. **A)** Planta matriz com frutos maduros; **B)** Indução de CN após duas semanas em cultivo e; **C)** Germinação da semente em meio de cultura MSB ;**D-G)** Início da proliferação das CNs (seta) após 6 semanas de cultivo: **D)** Em MSB com 4 μM de ANA; **E-F)** Em MSB com 0,1 μM de TDZ: **E)** Indução de CNs compactas e; **F)** Com a formação de nódulos; **G)** CN de coloração verde em MSB com 4 μM de BAP; **H)** CN em MSB + 4 μM de ANA e geleificado, observando-se também a germinação (seta) e; **I)** CNs granulares em meio MSB com 4 μM de BAP e a indução de brotos múltiplos (seta); **J-L)** Manutenção das CNs em meios geleificados quando originadas de: **J)** MSB com 4 μM de ANA de coloração verde; **K)** MSB com 4 μM de BAP de coloração verde amarelada e; **L)** MSB, regeneração de CNs amareladas; **M)** CN de baixa proliferação e com textura compacta (seta) quando originadas de 0,1 μM de TDZ . Barra: B-G; J-M = 3 mm e H, I barra = 1 cm

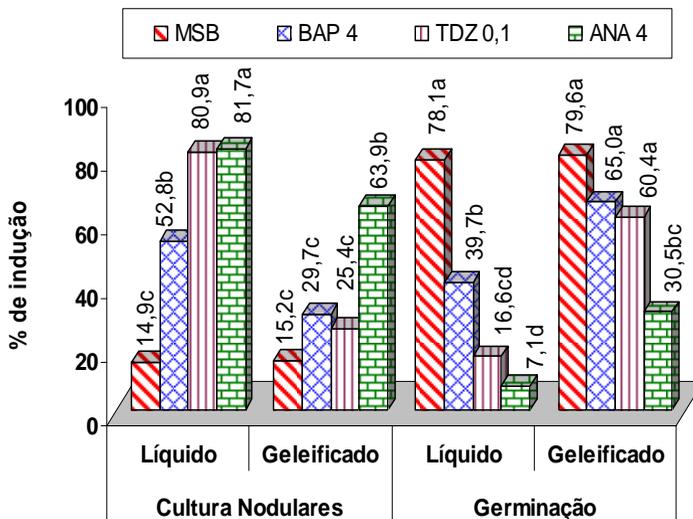


Figura 2. Indução de culturas nodulares¹ e germinação² a partir de sementes de *V. reitzii* cultivadas em diferentes meios de cultura: 1) MSB; 2) MSB + BAP (4 μ M); 3) MSB com TDZ (0,1 μ M) e 4) MSB com ANA (4 μ M) em combinação com o meio de cultura líquido, sobre ponte de papel filtro ou geleificado, após 6 semanas em cultura. * Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). ¹CV(%) = 17,6; ²CV(%) = 18,3.

Por outro lado, em outras espécies que não bromélias, como é o caso de *Nothapodytes foetida*, o uso do TDZ induziu a formação de aglomerados de gemas e o subcultivo em meio BAP mais AIB promoveu o alongamento dos brotos (Thengane et al., 2001). Rajeswari & Paliwal (2008) obtiveram taxas mais elevadas de indução de calo em resposta ao BAP a partir de explantes de epicótilo de *Albizia odoratissima* e o maior número de brotos adventícios regenerados foi obtido com a combinação de ANA com BAP. Alta frequência de regeneração de brotos foi obtida a partir de nódulos organogênicos induzidos a partir de segmentos de folhas ou de pecíolos de *Melothria maderaspatana* em resposta ao cultivo sucessivo em meio de cultura suplementado com 2,4-D mais TDZ ou BAP e, posteriormente, em meios de cultura suplementados com BAP e TDZ (Baskaran et al., 2009).

No presente trabalho, a maior ($p < 0,01$) porcentagem de germinação de sementes ocorreu em resposta ao meio de cultura MSB (Fig. 2), tanto líquido (78,1%), quanto geleificado (79,6%). O cultivo em frascos de vidro de 340 ml com meio geleificado resultou em maior

porcentagem média de germinação, quando comparados com o uso de meio líquido. Neste contexto, a germinação e o desenvolvimento das plântulas foram inversamente proporcionais à indução de CN. Assim, a suplementação de ANA ao MSB inibiu a germinação das sementes (Fig. 2). Em *T.reizii*, o aumento das concentrações de ANA suplementada ao meio de cultura Knudson inibiu o crescimento das plântulas, porém não reduziu a taxa de germinação das sementes (Pickens et al., 2003).

O cultivo em frascos de vidro de 340 ml com meio geleificado promoveu a indução e proliferação intensa de CN com maior frequência de germinação, mesmo na presença de fitoreguladores, após 17 semanas em cultivo (Fig. 1H, I - setas). Estas culturas apresentavam textura granular com diferenciação incipiente e coloração verde quando cultivadas na presença de 4 μM de ANA (Fig. 1H) e coloração verde amarelada com início de desenvolvimento múltiplo de microbrotos quando cultivadas em meio de cultura suplementado com 4 μM de BAP (Fig. 1I). Rech Filho et al. (2005) observou a formação de culturas de microbrotos de *V. reitzii* a partir da região basal de brotos em intensa proliferação em resposta ao meio de cultura MS suplementado com ANA e BAP.

Manutenção - O subcultivo a cada 15 semanas das CNs para MSB geleificado e suplementado com ANA e 2-iP (2 μM cada) permitiu a manutenção das CNs em ciclos repetitivos de proliferação por mais de 2,5 anos em cultivo (Fig. 1J). As diferentes características morfológicas observadas nestas culturas estiveram também relacionadas ao meio de origem. Desta forma, CNs originadas de MSB com ANA (4 μM) mantiveram a formação de aglomerados de nódulos organogênicos friáveis com diferenciação incipiente e de coloração verde-amarelada a translúcida (Fig. 1J). No entanto, CNs originadas de MSB com BAP (4 μM), mantiveram a textura friável e granular (Fig. 1K). Já, CNs originadas de MSB e subcultivadas em meios suplementados com ANA e 2-iP (2 μM cada) induziram a formação de novas CNs, de textura friável, coloração amarela a translúcida, assemelhando-se a culturas embriogênicas (Fig. 1L).

Por outro lado, CNs originadas do meio de cultura com TDZ (0,1 μM) e subcultivadas tanto em MSB isento de fitoreguladores, quanto em meio suplementado com ANA e 2-iP revelaram baixa capacidade proliferativa e textura mais compacta (Fig. 1M). Em outros trabalhos com bromélias foi também reportada a proliferação de nódulos globulares com textura compacta, os quais resultaram na regeneração de brotos. Isto foi observado em *A. comosus* 'variegatus' em resposta ao meio de cultura suplementado com ANA mais BAP (Teng, 1997) e

também em duas cultivares de Smooth Cayenne em resposta ao meio de cultura suplementado com TDZ e AIB (Firoozabady & Moy, 2004).

Regeneração de microbrotos - O cultivo de CN em meio MSB suplementado com AIA (4 μM) resultou em um maior número médio de microbrotos (1.468 brotos/g de CN), após nove semanas em cultivo (Tabela 1). Neste período, foi observada que a intensa proliferação e a regeneração de microbrotos ocorriam de forma repetitiva (Fig. 3A). A suplementação do meio de cultura com AIA e AG_3 (4 μM cada), promoveu um maior alongamento dos microbrotos, permitindo a individualização dos mesmos (Fig. 3B).

Tabela 1. Eficiência regenerativa* em relação à massa fresca (g) inicial e final a partir de CN de *Vriesea reitzii* e o número estimado de microbrotos/g** de CN em relação ao número de microbrotos produzidos, em resposta aos meios de culturas MSB suplementados ou não com diferentes fitorreguladores, após nove semanas de cultivo.

Fitorregulador (μM)	Massa fresca (g)		Eficiência regenerativa	Microbrotos produzidos	Estimativa de produção de microbrotos/g
	Inicial	Final			
AIA (4)	0,27	1,55	4,8 A ($\pm 0,47$)	391 A (± 49)	1.468 A (± 202)
AG_3 (4)	0,28	1,32	3,8 A ($\pm 0,48$)	318 B (± 42)	1.150 B (± 170)
AIA(4)+ AG_3 (4)	0,27	1,24	3,6 A ($\pm 0,71$)	292 B (± 70)	1.084 B (± 226)
ANA(1)+BAP(2)	0,27	1,27	3,7 A ($\pm 0,58$)	266 B (± 24)	993 B (± 111)
MS	0,27	1,29	3,8 A ($\pm 0,19$)	265 B (± 28)	988 B (± 131)
Média	0,27	1,33	4,0 ($\pm 0,49$)	305 (± 43)	1.137 (± 168)
	CV (%)		14,2	14,7	14,4

Média de quatro repetições. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Média (\pm desvio padrão). * Eficiência regenerativa = (Massa final - Massa inicial)/Massa inicial. ** Estimativa de microbrotos/g = N° de microbrotos produzidos/massa inicial (g).

Alves et al. (2006) relataram uma taxa regenerativa de 60 brotos/g de CN de *V. reitzii* originadas da base foliar de brotos cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP, Kin e 2-iP. Com esta mesma espécie, Rech Filho et al. (2005) obtiveram maior incremento de massa fresca e maior número de brotos regenerados em resposta ao uso de ANA e BAP. Amin et al. (2005) também obtiveram maior regeneração de brotos de *A. comosus* cv. Giant Kew com a suplementação de BAP e ANA ao meio MS. Em *V. splendens* a suplementação de TDZ ao meio de cultura MS resultou na maior produção de microbrotos (Dal Vesco et al., 2007). Explantes a partir de semente de *Embllica officinalis*, também revelaram a produção de brotos de adventícios em alta frequência quando cultivados com a

suplementação ao meio de cultura MS com BAP e AIA (Nayak et al., 2010).

Alongamento – O uso de 10 μM de AG_3 combinado ou não com todos os quatro níveis de AIA testados, promoveu um alongamento sincrônico dos microbrotos após 20 semanas em cultivo (Fig. 4). Neste caso, o modelo quadrático da análise de regressão foi o que melhor descreveu a evolução do número médio de brotos alongados por grama de CN em resposta a combinação de AIA com AG_3 e expressou valores de r^2 e T-valor ($p < 0.05$) significativos. Estes índices indicam a confiabilidade nas trajetórias quadráticas que, no caso de sistemas biológicos, consideram-se altos aqueles valores de r^2 que ocorrem entre 0,5 e 0,9 (Compton, 1994). A partir das derivações dos modelos de regressão propostos (Fig. 4) pode-se inferir que o número máximo de brotos alongados pode ser obtido em resposta ao uso de 2; 5 e 4,7 μM de AIA combinados com 10; 5 e 0 μM de AG_3 , resultando em 66,3; 52,1 e 37,6 por grama de CN respectivamente.

O subcultivo em frascos de 340 ml revelou intensa proliferação das CNs, porém, baixa taxa de alongamento dos microbrotos (Fig. 3D). Observou-se também que, o uso isolado de 4 μM de AIA ou de 10 μM de AG_3 resultou em maior número médio de brotos por grama de cultura inoculada (51,5 e 63,5 brotos/g, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas em resposta às diferentes concentrações de AIA e AG_3 testados, para a altura média dos microbrotos e para a eficiência regenerativa das culturas (Tabela 2). Neste contexto, para ocorrer o alongamento sincronizado dos microbrotos de *V. splendens* híbrida foram necessários 2-3 subcultivos em meio MS com AG_3 (Dal Vesco et al., 2007). Da mesma forma, dois subcultivos sucessivos em meios de cultura MS com AG_3 foram necessários para promover o alongamento de microbrotos de *V. reitzii* (Rech Filho et al., 2005). Nesta mesma espécie, o alongamento dos brotos ocorreu com o cultivo alternado entre o uso de AG_3 e isentos de fitorreguladores (Rech Filho et al., 2009).

Em *Nothapodytes foetida*, o subcultivo dos aglomerados de brotos em meio de cultura suplementado com BAP e AIB promoveu maior alongamento dos brotos (Thengane et al., 2001). Em *A. comosus* cv. Phuket o maior número de brotos (27,8 brotos) regenerados ocorreu em resposta ao uso de BAP em meio basal geleificado (Sripaoraya et al., 2003). Para a cv. Smooth Cayenne o subcultivo dos brotos adventícios em meio de cultura suplementado com BAP e AG_3 promoveu a regeneração múltipla de gemas e, concomitantemente, o alongamento dos brotos (Firoozabady & Moy, 2004).

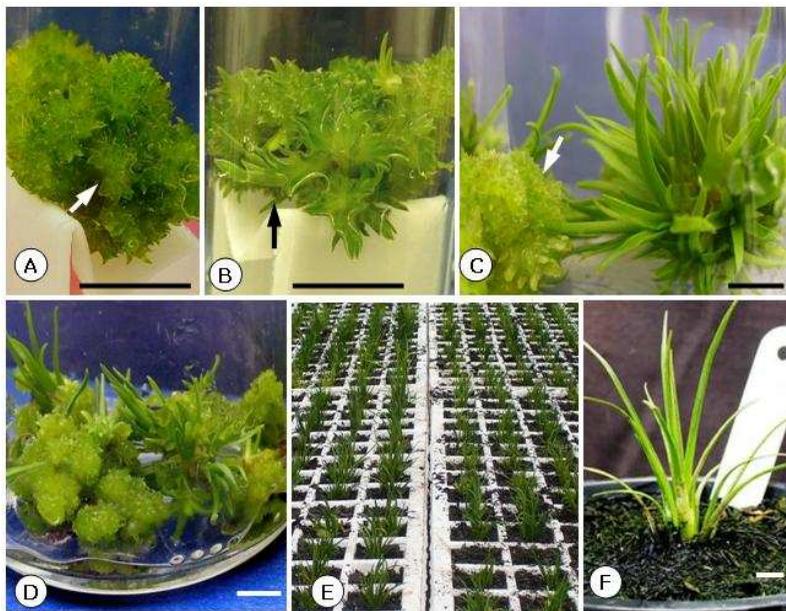


Figura 3. Regeneração e alongamento de microbrotos a partir de culturas nodulares (CN) de *Vriesea reitzii*, **A**) Microbrotos em meio MSB suplementado com 4 μM de AIA após 9 semanas em cultivo; **B**) Alongamento e individualização de microbrotos cultivados em meio suplementado com 4 μM de AIA e AG₃; **C**) Alongamento de microbrotos e regeneração de CN em meio MSB líquido suplementado com AG₃; **D**) Proliferação de CN e alongamento de microbrotos em meio de cultura suplementados com AIA e AG₃; **E**) Aclimatização dos brotos, e; **F**) desenvolvimento das mudas após 3 meses. Barra = 1 cm.

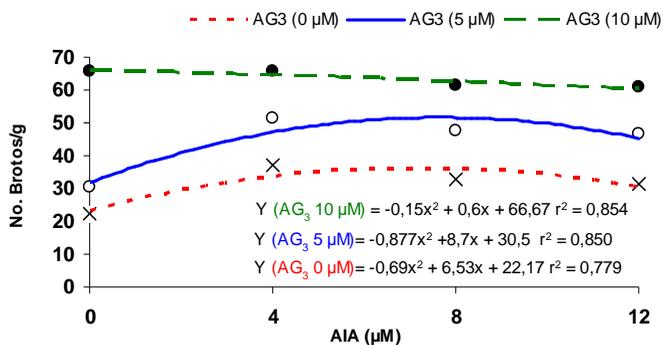


Figura 4. Evolução do número médio de microbrotos alongados por grama de CN de *V. reitzii* em resposta aos meios de cultura MSB suplementados com AIA (0, 4, 8 e 12 μM) e AG₃ (0, 5 e 10 μM), após 20 semanas de cultivo. * Média de três repetições.

Tabela 2. Eficiência regenerativa e o número médio estimado de microbrotos/g de culturas nodulares (CNs) de *Vriesea reitzii* e comprimento médio dos brotos a partir de CN em resposta ao meio de cultura MSB suplementado com AIA e AG₃ após 20 semanas em cultivo.

Fitorregulador	Massa fresca (g)		Eficiência regenerativa	Número de brotos/g	Comprimento (cm)
	AIA (μM)	Inicial			
0	2,09	10,36	3,96A (±0,39)	39,4B (±23)	0,3A (±0,07)
4	2,08	10,81	4,20A (±0,46)	51,5A (±14)	0,4A (±0,16)
8	2,12	10,82	4,10A (±0,20)	47,3AB (±14)	0,5A (±0,08)
12	2,11	10,43	3,94A (±0,14)	46,4AB (±15)	0,3A (±0,07)
Média	2,10 (±0,03)	10,60 (±0,27)	4,05 (±0,29)	46,1 (±17)	0,4 (±0,09)
AG ₃ (μM)					
0	2,12	10,48	3,94A (±0,14)	31,0C (±6)	0,3A (±0,09)
5	2,08	10,72	4,15A (±0,10)	44,0B (±9)	0,5A (±0,15)
10	2,1	10,61	4,06A (±0,29)	63,5A (±3)	0,4A (±0,08)
Média	2,1 (±0,02)	10,6 (±0,33)	4,05 (±0,18)	46,1 (±6)	0,4 (±0,11)
CV (%)			8,6%	*11%	35,9%

Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Média (±) = desvio padrão. * Dados transformados em $(x+0,5)^{0,5}$. Eficiência regenerativa = (Peso final - Peso inicial)/Peso inicial.

3.2. Indução de CN a partir explantes foliares

Indução - Todos os fitorreguladores e condições de cultivo testado induziram a formação de CN após quatro semanas em cultivo (Tabela 3). Estas CNs apresentaram estrutura globular e textura friável, eram translúcidas e revelaram alto potencial regenerativo (Fig. 5). A indução das CNs iniciou, em todos os tratamentos testados, a partir da região basal do segmento de folha empregado como explante (Fig. 5B-D e F-G) e revelou distintos padrões morfológicos em resposta aos diferentes meios de cultura, na presença e ausência de luz. Distintas características morfológicas também foram observadas na indução de calos organogênicos em *Helicteres isora* em resposta a diferentes tipos e níveis de fitorreguladores (Shriram et al., 2008).

Bases foliares cultivadas em meio MSB suplementado com ANA (2 μM) e BAP (4 μM) resultaram em taxas médias de 77,1% de indução de CN (Tabela 3). O uso de MSB suplementado com TDZ (1,0 μM) e 2-iP (2,0 μM) revelou taxas menores de indução de CN em relação aos

demais. Observou-se, também, que, tanto a presença quanto a ausência de luz resultaram em taxas similares de indução de CN (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de indução de culturas nodulares (CNs) a partir de base foliar de *Vriesea reitzii*, em resposta ao meio MSB suplementado com diferentes tipos e níveis de fitorreguladores e à presença ou ausência de luz, após quatro semanas em cultivo.

Fitorregulador (μM)	Luz		Média
	Presença (%)	Ausência (%)	
ANA (2,0) + BAP (4,0)	73,3	80,8	77,1a
ANA (4,0) + BAP (2,0)	84,7	66,1	75,4a
ANA (4,0) + 2-iP (2,0)	76,7	55,6	66,1a
ANA (20,0) + 2-iP (2,0)	61,1	65,3	63,2a
AIA (20,0) + 2-iP (2,0)	73,6	48,1	60,9a
AIB (20,0) + 2-iP (2,0)	60	53,7	56,9a
2,4-D (20,0) + 2-iP (2,0)	59,7	55	57,4a
TDZ (1,0) + 2-iP (2,0)	33,3	27	30,2 b
Média	65,3 A	56,5 A	60,9

* Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 15,8. Dados originais transformados em $(\log x+2)$.

Diferenças morfológicas expressivas foram observadas quanto à presença ou ausência de luz (Fig. 5). Culturas mantidas em fotoperíodo de 16h. apresentaram coloração esverdeada, consistência friável e elevado potencial de regeneração após 4 semanas de cultivo em MSB suplementado com ANA (4 μM) e BAP (2 μM) (Fig. 5B). Neste caso, observou-se também a indução de microbrotos diretamente dos explantes (Fig. 5C). Na ausência de luz as CNs eram branco-amareladas e progrediam rapidamente para microbrotos (Fig. 5D), em resposta ao meio de cultura suplementado com AIA (20 μM) e 2-iP (2 μM).

Nódulos organogênicos com diferentes níveis de organização foram descritos em outros sistemas *in vitro*, incluindo *Cichorium intybus* (Piéron et al., 1998), *Humulus lupulus* var. Eroica (Batista et al., 2000) e var. Nugget (Fortes & Pais, 2000), *Charybdis numidica* (Wawrosch et al., 2005) e *Populus euphratica* (Ferreira et al., 2009).

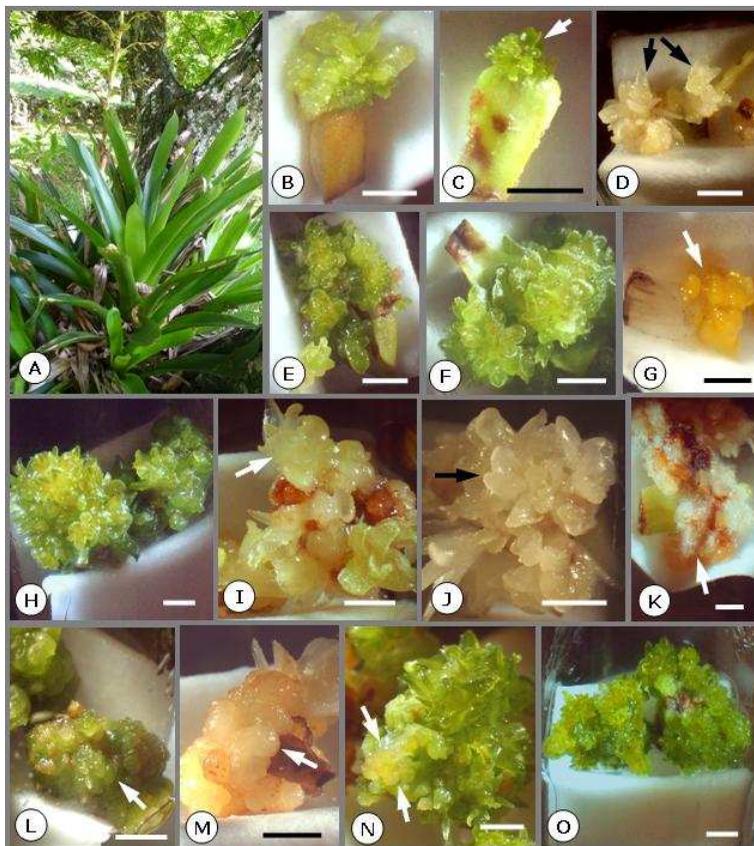


Figura 5. Indução e caracterização morfológica de CN a partir de explante foliar *V. reitzii*, cultivadas em MSB líquido e suplementados com diferentes fitorreguladores: **A)** Planta matriz; **B-D)** Indução de CN na base do explante após 4 semanas em cultura; **B)** CN verdes em meio de cultura suplementado com ANA (4 μ M) e BAP (2 μ M) na presença de luz; **C-D)** indução de microbrotos (ver setas) em meio de cultura com AIA (20 μ M) e 2-iP (2 μ M); **C)** Microbrotos originados diretamente do explante na presença de luz; **D)** Microbrotos diferenciados na ausência de luz; **E-H)** CN após 13 semanas de cultivo em: **E)** MSB suplementado com ANA (4 μ M) e 2-iP (2 μ M) e; **F)** MSB suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M); **G)** CN de coloração amarelada cultivada em MSB suplementado com de 2,4-D (20 μ M) e 2-iP (2 μ M) e; **H)** CN após 13 semanas em MSB suplementado com ANA (4 μ M) e BAP (2 μ M); **I-J)** Indução de novas CNs a partir das folhas dos microbrotos regenerados na ausência de luz (ver seta), após 18 semanas de cultivo em: **I)** MSB suplementado com de ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M), e; **J)** MSB suplementado com de AIB (20 μ M) e 2-iP (2 μ M); **K)** indução de raízes em MSB suplementado com de ANA (20 μ M) e 2-iP (2 μ M) na ausência de luz; **L-M)** Indução de CN com textura compacta (ver setas) em MSB suplementado com de TDZ (1 μ M) e 2-iP (2 μ M): **L)** Na presença de luz e; **M)** Na ausência de luz; **N-O)** Novas CNs (ver seta) após 22 semanas em cultivo em: **N)** MSB suplementado com de AIA (20 μ M) e 2-iP (2 μ M), e; **O)** CNs friáveis em MSB suplementado com ANA (4 μ M) e 2-iP (2 μ M). Barra = 3 mm.

CNs foram relatadas nas bromeliáceas *V. friburgensis* var. *paludosa* (Alves & Guerra, 2001) em *V. reitzii* (Alves et al., 2006 e Rech Filho et al., 2009), e em *V. splendens* Híbrida (Guerra & Dal Vesco, 2010). De forma similar ao presente trabalho, a região basal do segmento de folha de *A. comosus* também mostrou competência e foi responsiva tanto para a organogênese quanto para embriogênese somática (Firoozabady & Moy, 2004). Da mesma forma, bainhas foliares na região mais próxima do meristema apical de *Bactris gasipaes* revelaram maior competência embriogênica (Steinmacher et al., 2007).

Multiplicação – A multiplicação das Cns em ciclos repetitivos de proliferação ocorreu após 13 semanas em cultivo nos mesmos meios de cultura empregados para a indução e o padrão morfogênico manteve-se de acordo com o meio de cultura e ambiente de cultivo utilizado (Fig. 5E-M). Observou-se também que a maior regeneração de CN (Fig. 6A) e o maior número médio de microbrotos por explantes (Fig. 6B) ocorreram em resposta aos meios de cultura suplementados com ANA (2 ou 4 μM) combinado com 2-iP (2 μM) ou com AIA (20 μM) e 2-iP (2 μM) e quando as culturas eram mantidas na luz.

Cns mantidas na presença de luz caracterizaram-se por serem friáveis e, apresentarem cor verde e resultaram em ciclos repetitivos de proliferação de novas Cns e com diferenciação incipiente de microbrotos (Fig. 5E, F, H). Estas respostas estiveram preferencialmente associadas aos meios de cultura suplementados com ANA (4 μM) combinados com 2-iP (2 μM) ou com BAP (2 μM) (Fig. 5E, H). Porém, quando a proporção foi de 1:2 nos teores de ANA (2 μM) em relação ao BAP (4 μM), ocorreu, inicialmente, uma maior proliferação de microbrotos (Fig. 5F), seguido da indução de novas Cns e microbrotos sucessivamente. A proporção de 2:1 de ANA e BAP também favoreceu a indução de nódulos organogênicos a partir de explantes foliares de *Populus euphratica* e o subcultivo na proporção de 1:10 destes fitorreguladores promoveu a multiplicação e alongamento de brotos adventícios (Ferreira et al., 2009).

Cns cultivadas na presença de luz resultaram em maior e significativa ($p < 0,01$) produção de massa fresca (0,21g) e maior número médio de microbrotos (11,6 brotos) em comparação aos valores obtidos na ausência de luz (0,08g e 4,3 brotos, respectivamente). Porém, para estas duas condições de cultivo, não foram observadas diferenças significativas no comprimento médio dos microbrotos regenerados após 13 semanas de cultivo (Tabela 4).

Em todos os tratamentos observou-se o desenvolvimento das Cns, exceto para o meio de culturas suplementado com 2,4-D (20 μM) e

2-iP (2 μ M). Este meio de cultura resultou na indução de nódulos de cor amarelo-laranja (Fig. 5G), com baixa capacidade de proliferação e baixos valores médios de produção de massa fresca (Fig. 6A), não sendo observada a regeneração de microbrotos (Fig. 6B).

A proliferação das CNs e a produção de microbrotos de *V. friburguensis* var. *paludosa* ocorreram em resposta à combinação de 2,4-D (5 μ M) e Kin (1 μ M) (Alves & Guerra, 2001). Em *A. comosus* a indução de brotos adventícios a partir de bases foliares ocorreu em resposta ao 2,4-D e BAP (Sripaoraya et al., 2003). Em *Dyckia distachya*, Picloram ou 2,4-D resultaram na indução de culturas embriogênicas e o subcultivo subsequente em meios com ANA e 2-iP resultou na regeneração de plântulas (Pompelli et al., 2005). Já, a indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de *V. reitzii* ocorreu em resposta ao meio de cultura suplementado com 2,4-D (20 μ M) de e Kin (1 μ M) (Alves et al., 2006) ,e também, a combinação de Dicamba e Kin induziu a formação de cultura nodulares (Rech Filho et al., 2009).

Tabela 4. Massa fresca (g) de culturas nodulares (CNs), número médio de microbrotos e comprimento médio (cm) dos brotos a partir de base foliar de *V. reitzii*, em resposta ao meio de cultura MSB suplementado com diferentes tipos e níveis de fitoreguladores, na presença e ausência de luz após 13 semanas em cultivo.

Luz	Massa Fresca das CNs (g)	Número de brotos/explante	Comprimento (cm)
Presença	0,21 A	11,6 A	0,2 A
Ausência	0,08 B	4,3 B	0,2 A
Média	0,15	8,0	0,2
CV (%)	5,5	21,5	5,4

* Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Dados originais transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$.

No presente trabalho, quando as culturas foram mantidas na ausência de luz por 18 semanas observou-se também a proliferação de novas CNs sobre os microbrotos regenerados. Esta rota morfogenética iniciou com o intumescimento dos microbrotos (Fig. 5I), ou a formação de novas CNs diretamente das folhas jovens (Fig. 5J). Estes eventos caracterizam-se pela indução de ciclos repetitivos de proliferação, entre CN e microbrotos, confirmando a ocorrência simultânea da regeneração de ambos. Porém, culturas mantidas na presença de ANA (4 ou 20 μ M) e cultivadas na ausência de luz, além da baixa produção de CN,

formaram raízes (Fig. 5K). Por outro lado o meio MSB suplementado com de TDZ (1 μ M) E 2-iP (2 μ M) resultou na indução de CN com textura compacta tanto na presença (Fig. 5L), quanto na ausência de luz (Fig. 5M).

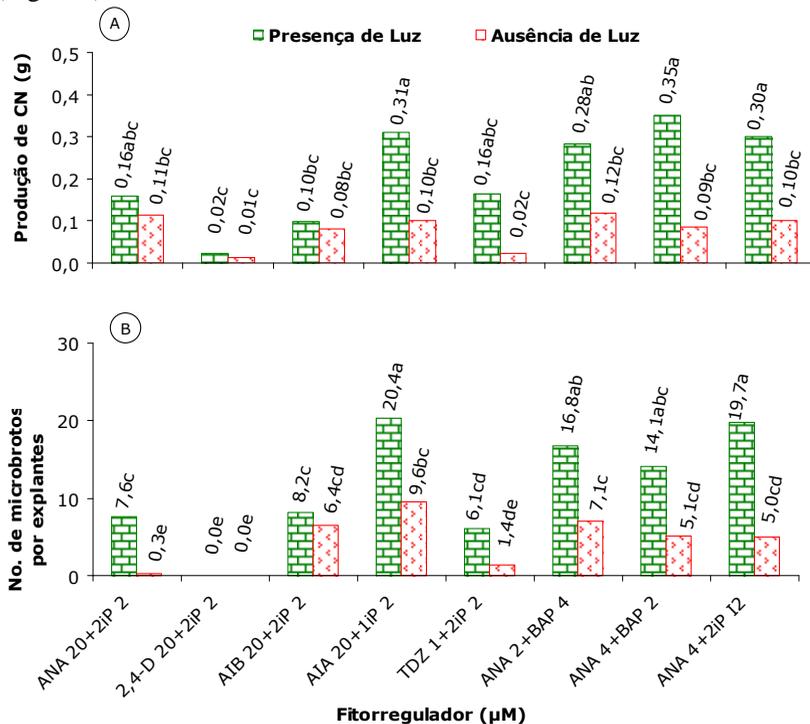


Figura 6. Produção de culturas nodulares (CNs) a partir de base foliar de *V. reitzii*: **A)** ¹Massa fresca (g) das CNs e; **B)** ²Número de microbrotos/explantes em resposta ao meio de cultura MSB suplementado com diferentes tipos e níveis de fitorreguladores após 13 semanas em cultivo. Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). ¹ CV(%) = 5,5; ² CV(%) = 21,5. Dados originais transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$.

Em explantes foliares de *Decalepis hamiltonii*, calos nodulares friáveis foram induzidos em meios de cultura suplementados com 2,4-D e BAP e o uso de ANA e BAP resultaram na indução de calos compactos. Quando estes calos foram subcultivados em meios com BAP e Zeatina observou-se a formação de embriões somáticos e brotos adventícios, respectivamente (Giridhar et al., 2004). Nódulos globulares induzidos em meios de cultura suplementados com TDZ mais AIB e com posterior subcultivo para meios com BAP e AG₃, resultaram na regeneração múltipla e no alongamento de brotos a partir de tecidos

foliares de *A. comosus* (Firoozabady & Moy, 2004). Em *Melothria maderaspatana*, tanto explantes foliares quanto de pecíolos cultivados em meio com 2,4-D combinado com TDZ ou BAP, respectivamente, produziram nódulos organogênicos, os quais, quando subcultivados em meio contendo BAP mais TDZ, resultaram em altas frequências de regeneração de brotos (Baskaran et al., 2009).

CNs mantidas por 22 semanas sem subcultivo no mesmo meio de cultura e na presença de luz produziram novas CNs a partir de microbrotos (Fig. 5N) e a partir delas mesmas, configurando ciclos repetitivos de regeneração de CN (Fig. 5O). Este padrão de resposta morfogênética *in vitro* parece ser recorrente no gênero *Vriesea* (Alves & Guerra, 2001; Rech Filho et al., 2005, 2009; Guerra & Dal Vesco, 2010).

Multiplicação - A taxa de multiplicação das CNs observada no presente trabalho esteve associada à composição do meio de indução e estabelecimento (Fig. 7). A maior ($p < 0,05$) eficiência regenerativa (8,6g/g de CN) foi obtida quando as culturas foram originadas em MSB suplementado com 4 μM de ANA + 2 μM 2-iP e posteriormente subcultivadas em meio de cultura MSB líquido e isento de fitoreguladores (Fig. 7). Por sua vez, o maior ($p < 0,01$) número de microbrotos regenerados ocorreu em resposta ao meio de cultura MSB suplementado com 2 μM de ANA e 4 μM de BAP (140,0 microbrotos/g), seguido do meio de cultura suplementado com 4 μM de ANA e 2 μM de BAP com 124,3 microbrotos/g de CN (Tabela 5).

O comprimento médio dos microbrotos ultrapassou a 1,0 cm. E, em relação à consistência física dos meios de cultura não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros avaliados (Tabela 5). Porém, o uso do meio geleificado permitiu a manutenção das CNs em ciclos repetitivos e, principalmente, promoveu a multiplicação das culturas originadas do meio de cultura suplementado com ANA ou de 2,4-D (20 μM cada) que, revelaram baixa proliferação (Fig. 7). O uso do meio geleificado promoveu maior taxa de regeneração de brotos/g a partir de nódulos de *Charybdis numidica* (Wawrosch et al., 2005). Tanto o meio líquido quanto o geleificado foram eficientes para a indução de nódulos organogênicos e a regeneração de brotos *in vitro* de *M. maderaspatana* (Baskaran et al., 2008). Segundo Ziv (2000) a consistência física do meio de cultura afeta a rota morfogênética das culturas *in vitro*.

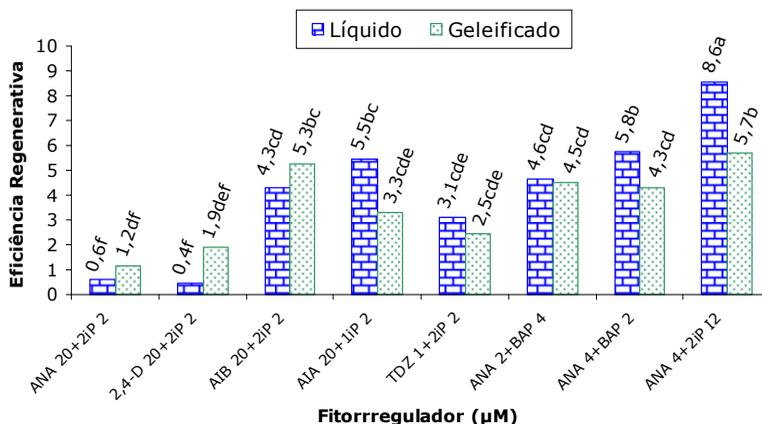


Figura 7. Eficiência regenerativa* das CNs a partir de base foliar de *Vriesea reitzii* em relação à combinação e concentração dos fitoreguladores do meio de origem e o subcultivo em meio de cultura MSB líquido ou geleificado, 13 semanas de cultivo. Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 14,7. Dados originais transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$. * Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

Protocolos regenerativos *in vitro* baseados em CNs podem ser empregados como estratégia eficiente para a micropropagação de bromélias em grande escala. A competência deste tipo de cultura por promover elevadas taxas regenerativas está relacionada ao tipo de tecido utilizado e sua determinação em resposta aos estímulos aplicados. Modificações podem ser requeridas durante o processo de cultivo para a aquisição desta competência (Hicks, 1994). Esta rota morfogênica pode seguir um caminho de diferenciação que culmina na produção múltipla de brotos adventícios em resposta aos meios de cultura apropriados (Gahan & George, 2008).

A manutenção das CNs em ciclos repetitivos, observada neste trabalho, apresentou a seguinte seqüência de eventos: i) indução de CN; ii) regeneração de microbrotos; iii) indução de novas CNs a partir de microbrotos ou; iv) a regeneração de microbrotos e CN de forma contínua. No entanto, estes eventos foram dependentes do ambiente de cultivo, do tipo, concentração e balanço dos fitorreguladores suplementados ao meio de cultura.

Aclimatização - Brotos alongados com altura superior 3,0 cm resultou em mais de 95% de sobrevivência, após 30 dias da transferência para bandejas (Fig. 3E). O transplante das mudas aclimatizadas para

vasos de 350 ml resultou no pleno desenvolvimento das plantas após três meses (Fig. 3F).

Tabela 5. Eficiência regenerativa* das CNs, número médio estimado de microbrotos/g de CN e comprimento (cm) dos brotos *Vriesea reitzii* em resposta à combinação e concentração dos fitoreguladores do meio de origem, após 13 semanas com o subcultivo em meio de cultura MSB isento de fitoreguladores.

Meio de origem (μ M)	Massa fresco (g)		Eficiência regenerativa	Nº estimado de microbrotos/g	Comprimento (cm)
	Inicial	Final			
ANA (4,0) + 2-iP (2,0)	0,39	3,21	7,2 a	88,1 bc	0,6 ab
ANA (4,0) + BAP (2,0)	0,41	2,49	5,1 b	124,3 ab	0,8 a
ANA (2,0) + BAP (4,0)	0,42	2,37	4,7 b	140,0 a	0,6 ab
AIB (20,0) + 2-iP (2,0)	0,44	2,58	4,8 b	77,3 cd	0,8 a
AIA (20,0) + 2-iP (2,0)	0,42	2,24	4,4 b	67,1 cd	0,9 a
TDZ (1,0) + 2-iP (2,0)	0,42	1,61	2,8 c	86,0 bc	0,4 c
2,4-D (20,0) + 2-iP (2,0)	0,21	0,46	1,2 d	0,0 e	0,0 c
ANA (20,0) + 2-iP (2,0)	0,32	0,61	0,9 d	49,2 d	0,9 a
Média	0,38	1,95	3,9	79	0,6
Consistência física do meio					
	Líquido		4,1 A	78,7 A	0,6 A
	Geleificado		3,6 A	79,3 A	0,7 A
	CV (%)		14,7	17,2	10,5

Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Dados originais transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$. * Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

Em conclusão, no presente trabalho, os diferentes padrões morfológicos e taxas de indução e proliferação das CNs observados a partir de sementes e bases foliares de *V. reitzii* estão associados, especificamente, as concentrações e combinações de cada fitoregulador testado, bem como às condições de cultivo. Nestas condições o modelo regenerativo baseado na indução, multiplicação e desenvolvimento de CN de *V. reitzii* aqui descrito se configuram como um sistema de micropropagação de alta eficiência regenerativa para esta e outras bromélias do mesmo gênero que apresentam potencial ornamental ou se encontrem ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, G.M. & Guerra, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **J. Bromeliad Soc.** v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- Alves, G.M.; Dal Vesco, L. L. & Guerra, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** v.110, p.204–207, 2006.
- Amin, M.N., Rahman, M.M., Rahman, K.W., Ahmed, R. Hossain, M.S., Ahmed, M.B. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L) Merr; cv. Giant Kew]. **Inter. J. Botany**, v.1, p.128-132, 2005.
- Aranda-Peres, A.N.; Rodriguez, A.P.M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006, v.4, pp. 644-655.
- Baensch, U. & Baensch, U. **Blooming Bromeliads**. Rasch Druck Verlag, Bramsche, GE. 1994.
- Baskaran, P.; Velayutham, P.; Jayabalan, N. In vitro regeneration of *Melothria maderaspatana* via indirect organogenesis. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.**, v. 45, p.407-413, 2009. DOI 10.1007/s11627-008-9172-8
- Batista, D., Ascensão L., Sousa, M. J., Pais, M. S. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Science**, v.151, p. 47–57, 2000.
- Benzing, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 2000, 690p.
- Compton, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** v.37, p.217-242, 1994.
- Dal Vesco, L.L.; Pinto, A. De A. Zaffari, G. R.; Nodari, R.O. Reis, M. S. Dos; & Guerra, M.P.; Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**. v.56, p.143-154, 2001.
- Dal Vesco, L.L.; Ribeiro, R.J.; Guerra, M.P. Otimização da micropropagação de bromélias ornamentais em sistema biofábrica. **Rev. Brasileira de Hort. Ornamental**, v.13, Suplemento, p.725-728, 2007.
- Droste, A.; Silva, A.M. da; Matos, A.V.; Almeida, J.W. de. *In Vitro* Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Braz. Archives Biol. Techn.** v.48, n. 5, p. 717-722, 2005.
- Ferreira, S.; Batista, D. Serrazina, S. Pais, M. S. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. **Plant Cell Tiss Org. Cult.** v. 96, p.35–43, 2009.
- Firoozabady, E. & Moy, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.40, p.67–74, 2004.
- Fortes, A. M. & Pais, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. **Am. J. Botany**, v. 87, n. 7, p. 971–979, 2000.

- Gahan, P.B. & George, E.F. **Adventitious Regeneration**. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3^a Edição, Springer, pp.355-401, 2008.
- George, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1, 2 ed. Exegetics: Edington, 1993, 574 p.
- Giridhar, P.; Kumar, V.; Ravishankar, G. A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.40, p.567–571, 2004.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press-Springer, 2010, v.589, pp.47-66.
- Hicks, G. H. - Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. Review. **In Vitro Cell Dev. -Biol.**, v. 30P, p.10-15; 1994.
- Klein, R. M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção do estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro: IBGE - Diretoria de Geociências, 1990, 288p.
- Leme, E.M.V. and Costa, A. A new species from Southern Brazil, a tribute to Father Raulino Reitz. **J. Bromeliad Soc.** **41**, 195-198, 1991.
- Lopes, A.V., Girão, L.C., Santos, B.A., Peres, C.A., Tabarelli, M. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. **Biol. Cons.** v.142, p.1154-1165, 2009.
- Luther, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 2008. 114p.
- Martinelli, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific Am.**, v. 282, p. 86-93, 2000.
- Martinelli, G.; Vieira, C. M.; Gonzalez, M.; Leitman, P.; Piratininga, A.; Ferreira da Costa, A.; Forzza, R.C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2008.
- Metzger, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biol. Cons.** v.142, p. 1138–1140, 2009.
- Morel, G.M. & Wetmore, R.H. Tissue culture of monocotyledons **Am. J. Botany**, 38:138-140, 1951.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497. 1962.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- Nayak, P. Behera, P.R, Thirunanmavok, M., Chand. High frequency plant regeneration through adventitious multiple shoot organogenesis in epicotyl explants of Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn). **Scientia Hort.**, v.123, p. 473-478, 2010.
- Pickens, K.A.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y.; Wolf, J.H.D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. **HortScience**, v.38, p.101–104, 2003.
- Pickens, K.A.; Wolf, J.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.42, p.348–353, 2006.

- Piéron, S.; Boxus, P.; Dekegel, D. Histological study of nodule morphogenesis from *Cichorium intybus* L. leaves cultivated *in vitro*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.34, p.87-93, 1998.
- Pompelli, M.F. Guerra, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breed. Applied Biotech.**, V.4, p.273-279, 2004.
- Pompelli, M.F., Fernandes, D. and Guerra, M.P. Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (*Bromeliaceae*) - An endangered bromeliad from South Brazil. **Prop. Orn. Plants**, v.5, p.192-98, 2005.
- Rajeswari, V.; Paliwal, K. In vitro adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from seedling explants of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth.). **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**, v.44, p.78-83, 2008.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L. Nodari, R.O. Lischka, R.W. Müller, C.V.; Guerra, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biod. Cons.**, v.14, p.1799-1808, 2005.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L.; Guerra, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.909-912, 2009.
- Reitz, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues. 1983, 559p.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F., Hirota, M.M., Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biol. Cons.**, v.142, p. 1141-1153, 2009.
- Rodrigues, R.R., Lima, R.A.F., Gandolfi, S., Nave, A.G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biol. Cons.**, v.142, 1242-1251, 2009.
- Shriram, V.; Kumar, V.; Shitole, M.G. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. **In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant**, v.44, p.186-193, 2008.
- Smith, L.B. and Downs, R.J. **Tillandsioideae (Bromeliaceae)**. Flora Neotrop. NY: Hafner Press, 1977.
- Sripaoraya, S.; Marchant, R.; Power, J. B.; Davey. M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas Comosus* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 39, p.450-454, 2003.
- Steel., R.G.D.; Torrie, J.H. **Principles and procedures of statistics** – A biometrical approach. 2. Ed. New York: McGraw-Hill Book Co. 1980, 633p.
- Steinmacher, D. A.; Krohn, N.G.; Dantas, A.C.de M.; Stefenon, V.M.; Clement, C. R.; Guerra, M.P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Ann. Bot.**, v. 100, p. 699-709, 2007.
- Teng, W.L. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. **Plant Cell Rep.** v.16, p.454-457, 1997.
- Thengane, S. R.; Kulkarni, D. K.; Shrikhande, V. A.; Krishnamurthy, K. V. Effect of thidiazuron on adventitious shoot regeneration from seedling explants of *Nothapodytes foetida*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.37, p.206-210, 2001.

- Wawrosch, Ch.; Kongbangkerd, A.; Köpf, A.; Kopp, B. Shoot regeneration from nodules of *Charybdis* sp.: A comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems. In: Hvoslef-Eide, A.K. and Preil W. (eds.). **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation**. Netherlands: Springer. 2005, pp. 275–280.
- Ziv, M. Bioreactor technology for plant micropropagation. **Horticul. Reviews**, v.24, p.1-30, 2000.

7. CAPÍTULO 3

Morfogênese *in vitro* e regeneração de brotos adventícios em grande escala a partir de culturas nodulares de *Vriesea reitzii*

[Artigo aceito para publicação no Periódico Scientia Horticulturae]

Lirio Luiz Dal Vesco⁵, Miguel Pedro Guerra^{1*}

RESUMO

O sistema de micropropagação baseado em culturas nodulares (CNs) diferencia-se dos sistemas regenerativas tradicionais. Esta rota da morfogênese *in vitro*, tal como observada em *V. reitzii*, não se enquadra tanto da organogênese tradicional quanto da embriogênese somática, por apresentar elevadas taxas regenerativas e, por isto, pode ser definida como uma via intermediária. CN de coloração verde-amareladas mantidas em meios de cultura MSB líquido e isento de fitorreguladores, foi à fonte de explantes para os ensaios de regeneração e alongamento de brotos. Para o ensaio de regeneração das CNs foram testados quatro concentrações de ANA (0, 2, 4 e 6 μM) em combinação com duas de 2-iP (0 e 2 μM). Dois ensaios de alongamento foram testados o meio de cultura MSB suplementado com AG₃ (0; 5; 10 e 15 μM) utilizando tubos de ensaio, sobre ponte de papel e frascos de 340ml. A maior eficiência regenerativa e a proliferação de micro brotos em grande escala foram obtidos com o uso do meio MSB suplementado com 2 μM de ANA e 2 μM de 2-iP. O subcultivo em meio MSB suplementado com 10 μM de AG₃ promoveu um maior alongamento de brotos e de forma sincronizada. A utilização destes meios de cultura pode ser obtida uma eficiência regenerativa de 12,4 g/g de CN inoculada. Estima-se, a partir disto, uma regeneração de mais de 5.300 novos microbrotos e na fase de alongamento, uma taxa efetiva de 75% destes microbrotos podem ser convertidos em brotos completos a cada 10 semanas de cultivo. As análises estruturais das CNs revelaram que o processo morfológico regenerativo de microbrotos ocorre a partir da proliferação de grupos de células meristemáticas e que desenvolvem a formação de múltiplos meristemas caulinares e com o desenvolvimento dos primórdios foliares resulta na formação de estruturas monopolares denominadas de microbrotos. Estas estruturas regenerativas sustentam a classificação de CNs organogênicas.

⁵ Programa de Pós- graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. E-mails: lirio@cca.ufsc.br; * Autor Correspondente: mpguerra@cca.ufsc.br

Palavras chaves: Bromeliáceas, cultura nodular, eficiência regenerativa, histologia, MEV, microbrotos, propagação massal.

Abreviaturas: ANA-ácido naftalenoacético; BAP-6-benzilaminopurina; CNs - Culturas nodulares; MSB – meio básico MS; 2-iP - N⁶ (2-isopentenil) adenina; AG₃ – ácido giberélico; MS – Murashige & Skoog (1962); MEV- microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures

The micropropagation system based on nodular cultures (NCs) diverges from the *in vitro* regenerative systems based on organogenesis and somatic embryogenesis, being considered as an intermediary route. The aim of this study was to establish a regenerative protocol based on the induction and development of NCs in *Vriesea reitzii*, an endangered bromeliad from the Atlantic Forest which also shows ornamental features. Additionally structural analyses were performed in order to better understand this *in vitro* morphogenetic route. NCs were regenerated in MSB culture medium free of PGR or supplemented with different levels of NAA in combination or not with 2-iP. The subculture of these NCs to MSB medium supplemented with 10 μ M of GA₃ promoted the synchronized shoot elongation. A regenerative efficiency of 12.4 g g⁻¹ of NCs was obtained, and this results in 5,300 microshoots after 10 weeks in culture. The structural analyses of the NCs revealed that the regenerative process occurs from the proliferation of meristematic cell groups resulting in the development of multiple shoot meristems and buds. The development of NCs lead to the formation of monopolar structures called microshoots, which evolves to elongated shoots. Intermediary features shown in NCs are consistent with their classification as an intermediary system among organogenesis and somatic embryogenesis.

Keywords: Bromelids, nodular cultures, histology, microshoots, mass propagation.

Abbreviations: BAP-6-benzylaminopurine; NAA- α -naphthaleneacetic acid; NCs – nodular cultures; MSB – MS basal medium; 2-iP - N⁶ (2-isopentenyl) adenine; GA₃ – gibberellic acid; MS – Murashige and Skoog (1962); SEM - scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

As bromélias estão entre as espécies de maior importância ecológica e econômica associadas ao Bioma Mata Atlântica, em razão da fragmentação deste ecossistema e do interesse da utilização destas

espécies como ornamentais. Este bioma apresenta alta biodiversidade e endemismo, sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade, com mais 20.000 espécies de plantas, 40% das quais são endêmicas (Myers *et al.* 2000). Estima-se que seus remanescentes primários apresentam apenas de 7-8% da estrutura original (Galindo-Leal & Câmara, 2003), sendo que estes se apresentam na forma de fragmentos, na maior parte das vezes com áreas inferiores a 50 ha (Ribeiro *et al.*, 2009). Este bioma apresenta, também, índices elevados de diversidade de mamíferos, anfíbios, répteis e aves (Heywood, 1995), que estão associados direta ou indiretamente ao complexo subsistema ecológico das bromélias. Nestes microhabitats, formados, por exemplo, pelos verdadeiros aquários das bromélias, encontram-se as espécies que coabitam criando entre si relações de co-evolução. Cada uma destas espécies contribui, portanto, com sua parcela para a manutenção da estabilidade destes ecossistemas florestais, em função das especializações e adaptações climáticas (Benzing, 2000; Martinelli, 2000, Aranda-Peres & Rodriguez, 2006).

A família Bromeliaceae é composta por 58 gêneros e 3172 espécies e subespécies (Luther, 2008) e mais da metade delas são epífitas (Martinelli, 2000). O gênero *Vriesea* Lindley pertence à subfamília Tillandsioideae, que compreende 261 espécies e 44 variedades e formas (Luther, 2008), sendo que 31 destas espécies são endêmicas do Estado de Santa Catarina (Reitz, 1983). Entre elas, *Vriesea reitzii* Leme & Costa é uma bromélia nativa e ameaçada da Mata Atlântica de Santa Catarina (Figura 1A), ocorrendo em altitudes entre 750m e 1200m (Baensch & Baensch, 1994) e predominando nos ecossistemas da Floresta Ombrófila Mista (Leme & Costa, 1991).

Em bromélias, estratégias baseadas nas técnicas de cultura de tecidos vegetais podem possibilitar a propagação em larga escala, tanto para a captura e fixação de ganhos genéticos para efeitos ornamentais, quanto para a sua conservação. Alguns padrões de respostas morfogênicas *in vitro*, observados e descritos em bromélias revelam características diferenciadas dos sistemas regenerativos tradicionais baseados na organogênese e embriogênese somática (Alves *et al.*, 2006, Guerra e Dal Vesco, 2010). Estes sistemas regenerativos foram definidos como culturas nodulares (CNs), as quais apresentam alto potencial regenerativo, sendo já descritos para o gêneros *Vriesea* (Alves & Guerra, 2001, Rech Filho *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006 e Guerra & Dal Vesco, 2010) e em *Ananas* (Teng, 1997 e Firoozabady & Moy, 2004). Esta rota morfogênética, ao revelar características distintas tanto da organogênese quanto da embriogênese somática, pode ser definida como uma terceira rota da morfogênese *in vitro* (George, 1993).

Sistemas similares às CNs descritas em bromélias foram reportados em *Humulus lupulus*, sendo denominados de culturas nodulares organogênicas (Batista et al., 2000) ou nódulos organogênicos (Fortes & Pais, 2000; Forte et al., 2002). Por nódulos organogênicos foram também descritos para *Populus euphratica* (Ferreira et al., 2009). Porém, em *Decalepis hamiltonii* foram denominadas de calos nodulares (Giridhar et al., 2004) e em *Sclerocarya birrea* foram descritos como nódulos meristemáticos (Moyo et al., 2009).

A competência celular do explante em induzir estas rotas regenerativas depende da sua capacidade de resposta aos sinais extracelulares, entre eles a composição basal do meio de cultura, o tipo e balanço dos fitorreguladores utilizados e ao ambiente de cultivo (Preece, 2008). Esta competência está também associada juvenildade dos tecidos e órgãos dos explantes (Gahan & George, 2008).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer e descrever as características morfogenéticas de um sistema regenerativo baseado na indução, proliferação e desenvolvimento de CN de *V. reitzii* em diferentes meios de cultura e combinações de fitorreguladores.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas nodulares (CNs) foram induzidas a partir de bases foliares de brotos de *V. reitzii* cultivados *in vitro*. Para isto, CNs foram inoculadas em tubos de ensaio (22 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura composto pela formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), sacarose (30g L^{-1}) denominado doravante de meio MS básico (MSB). Este meio de cultura foi suplementado com $4\ \mu\text{M}$ de ANA-ácido α -naftalenoacético e $2\ \mu\text{M}$ de 2-iP-N⁶(2-isopentenil) adenina. Em seguida, CNs foram multiplicadas e mantidas em meio MSB geleificado e isento de fitorreguladores, por dois subcultivos de 13 semanas cada, utilizadas como fonte de explantes para este trabalho (Fig. 1B). As condições de cultivo seguiram os procedimentos descritos por Alves et al. (2006). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem a 1,3 atm durante 16 min.

Regeneração de microbrotos – Avaliaram-se os efeitos de diferentes combinações e concentrações de fitorreguladores suplementados ao meio de cultura MS básico líquido. O desenho experimental seguiu um esquema fatorial (4x2) com oito tratamentos: quatro concentrações de ANA (0, 2, 4 e $6\ \mu\text{M}$) em combinação com duas de 2-iP (0 e $2\ \mu\text{M}$) na forma de blocos completos casualizados (BCC). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de

ensaios (25 x 150 mm), contendo 15 ml de meio de cultura e inoculados com aglomerados de CN com $0,132\text{g} \pm 0,005\text{g}$ de massa fresca por tubo, sobre ponte de papel filtro com quatro repetições. Dados de massa fresca das CNs, bem como o número de microbrotos regenerados foram coletados após 10 semanas de cultivo.

Alongamento de microbrotos - Experimento 1 – Avaliou-se a suplementação ao MSB líquido de diferentes concentrações de AG_3 - ácido giberélico. O desenho experimental foi um esquema fatorial com 32 tratamentos: quatro concentrações de AG_3 (0, 5, 10, 15 μM) em combinação com os oito meios de cultura de origem (ensaio de regeneração), na combinação de quatro concentrações de ANA (0, 2, 4 e 6 μM) com duas de 2-iP (0 e 2 μM). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaios (22 x 150 mm) contendo 15 ml dos meios de cultura líquido e inoculados com $0,2\text{g} \pm 0,02\text{g}$ de massa fresca de CN por tubo, sobre ponte de papel filtro, disposto em BCC com quatro repetições. Dados de número de brotos alongados por classe de altura de brotos e massa fresca das culturas nodulares, bem como microbrotos não alongados foram coletados após 10 semanas de cultivo.

Experimento 2 – Foram utilizados como fonte de explantes os microbrotos não alongados (3-5 mm) do ensaio 1 e subcultivados em frascos de vidro com capacidade de 340 ml, contendo 18 ml de meio de cultura líquido. O desenho experimental foi um esquema fatorial com 32 tratamentos, os mesmos utilizados no ensaio 1. Cada unidade experimental foi constituída de cinco frascos inoculados com aglomerados de CN com $1,0\text{g} \pm 0,01\text{g}$ de massa fresca por frasco, distribuídas em forma de BCC com três repetições. Dados de número de brotos alongados por classe de altura de brotos e massa fresca foram coletados após 10 semanas de cultivo.

Aclimatização – Brotos alongados foram transferidos para substratos compostos por uma mistura de substrato comercial Plantmax[®], casca de arroz carbonizada e casca composta de arvores (1:1:1 v/v) dispostos em bandejas de isopor com 128 células. As mudas foram mantidas em túnel de nebulização com irrigação intermitente. O delineamento do experimento foi em BCC com 32 tratamentos, mantendo os meios de cultura de origem descritos nos ensaios de alongamento. Cada unidade experimental foi constituída de 8 aglomerados de brotos (média de 6-7 brotos/aglomerado) e três repetições. Dados de porcentagens de sobrevivência foram coletados após 10 semanas.

Procedimentos Histológicos - Amostras representativas das culturas nodulares foram coletadas em diferentes períodos de cultivo e

fixadas por 24 horas em solução FAA 70%, (5% de formaldeído: 90% álcool 70 °GL: 5% ácido acético) (v:v:v). Durante o processo de fixação o material foi colocado em câmara de vácuo. Em seguida as amostras foram desidratadas em série em série etílicas (etanol) gradual (70–96 %) por 30 min cada. As amostras foram imersas em solução de pré-infiltração do Kit de historesina Leica® [50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila (ativador)] com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram imersas em de solução de infiltração pura durante 24h e incluídas em solução de infiltração com Endurecedor Leica® (dimetil sulfóxido) na proporção de 15:1 (v/v) e orientadas em cápsulas gelatinosas. Secções (5-7 µm) foram obtidas usando microtomo de rotação SLEE Technik®, distendidas em lâminas com uma gota de água e mantidas por 1-2h a temperatura de 42 ±2 °C. Após a evaporação da água foram coradas com azul de toluidina O a 0.05% em H₂O e os aspectos relevantes foram identificados e fotografados usando câmara DP 71 acoplada a microscópio BX-40 da Olympus®.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Amostras representativas das culturas *in vitro* foram coletadas em diferentes períodos e fixadas glutaraldeído (2.5 %) em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,2) por 16-18 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram lavadas por três vezes em tampão sem fixativo e desidratada em série em série etílica (etanol) gradual (10–100%), por 30 min cada. Em seguida foram colocar em éter etílico (PA) e mantidas em freezer (-20 °C) por 24 horas, procedimento utilizado para substituir o ponto crítico de CO₂. Após evaporar o éter, as amostras foram montadas sobre suporte de alumínio (stub) com dimensões de 9,5 de Ø x 10 mm de altura coladas com fita carbono dupla face. Anteriormente as análises as amostras foram mantidas em sílica e metalizadas com uma fina camada de ouro. Imagens relevantes foram obtidas em microscópio JEOL® modelo JSM-6390LV a 10 kV.

Análise estatística – Dados de cada parâmetro foram submetidos ao teste F_{\max} para verificar heterogeneidade das variâncias (S^2). Quando necessário os dados originais foram transformados em $\log(x+1)$ ou $(x+0,5)^{0,5}$. Estes dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias usando Statgraphics software, versão 7.0. Dados quantitativos foram avaliados pela análise de regressão de acordo com Compton (1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento e manutenção - CNs são definidas, neste trabalho, como aglomerados de nódulos organogênicos friáveis com diferenciação incipiente, coloração verde-amarelada a translúcida, (Fig. 1B). Eventualmente as culturas revelam o desenvolvimento incipiente de microbrotos (Fig. 1C). Estas culturas foram mantidas por subcultivos sucessivos por mais de dois anos em meio MSB geleificado e isento de fitoreguladores e intercalados com a suplementação de ANA (2 ou 4 μM e 2-iP (0 ou 2 μM). No entanto, o subcultivo de $\pm 0,132\text{g}$ destas CNs para meios de cultura MSB líquidos, suplementados ou não com ANA e 2-iP e sobre ponte de papel filtro (Fig. 1D), resultou na proliferação de novas CNs (Fig. 1E). Estas culturas, após seis semanas em cultivo, apresentavam intensa proliferação, textura friável e diferenciação incipiente de microbrotos (Fig. 1F).

Rotas morfogenéticas semelhantes a do presente estudo, também foram obtidas para outra bromélia (*Tillandsia eizii*), para a qual, culturas com numerosas gemas adventícias e com alta capacidade de proliferação foram mantidas em meio basal por mais de seis meses (Pickens et al., 2006). Em *Humulus lupulus* pequenos aglomerados diferenciaram-se em nódulos organogênicos de coloração verde-amarelados e, quando transferidos para meios de cultura líquido desenvolveram-se em pequenos brotos (Batista et al., 2000). A indução de nódulos a partir de explantes foliares de *Charybdis numidica* foi favorecida com o uso do meio MS líquido suplementado com BAP (Kongbangkerd et al., 2005). Em *Amorphophallus albus* calos friáveis foram obtidos a partir de segmentos de pecíolo após duas semanas em cultura em resposta ao meio MS suplementado com ANA e BAP (Hu & Li, 2008). Já, em *Helicteres isora* a indução de brotos adventícios ocorreu a partir de calos morfologicamente distintos apresentando textura granular em meio de cultura suplementado com BAP e Kin (Shriram et al., 2008). Em *Populus euphratica* a diferenciação de brotos adventícios foi obtida a partir de nódulos organogênicos em meio MS suplementado com ANA e BAP (Ferreira et al., 2009). O uso de ANA e BAP também induziu aglomerados de nódulos meristemáticos a partir de explantes foliares de *Sclerocarya birrea* (Moyo et al., 2009).

Regeneração – Culturas com expressiva regeneração em microbrotos foram observadas a partir da oitava semana em cultivo. Isto foi observado principalmente em resposta ao uso do meio de cultura MSB líquido suplementado com ANA (2 μM) e 2-iP (2 μM) após 10 semanas em cultivo (Fig. 1G). Após 21 semanas no mesmo meio de cultura observou-se uma intensa e sincrônica proliferação de

microbrotos (Fig. 1H), os quais apresentavam tamanho médio entre 3 a 5 mm (Fig. 1I).

O padrão morfogenético associado à indução e proliferação de CN observado no presente trabalho culmina com o desenvolvimento e regeneração em grande escala de microbrotos que evoluem para brotos completos. Estas características parecem ser recorrentes na cultura *in vitro* de *V. reitzii*. e foram descritas também para este mesmo gênero em outros trabalhos (Rech Filho et al., 2005 e 2009, Alves et al., 2006, Guerra & Dal Vesco, 2010). Ainda de acordo estes autores, o padrão de coloração e textura é modulado pela composição do meio de cultura utilizado na fase de indução. Com base na competência regenerativa destas CNs elas se configuram em excelente fonte para a produção massal de mudas em larga escala e a baixo custo, principalmente, quando associado ao uso de biorreatores (Paek et al., 2005).

CNs com expressivas taxas regenerativas médias de 10,3 vezes em relação ao inoculo inicial foram observadas em resposta ao meio de cultura MSB líquido, suplementado com diferentes concentrações de ANA em combinação com 2-iP (Tabela 1). Com base no número médio total de microbrotos regenerados neste ensaio, as projeções médias estimadas permitem inferir uma produção de 3.300 novos microbrotos/g de CN após 10 semanas em cultivo. Observou-se também que a maior eficiência regenerativa (12,4 vezes) e o maior número estimado de microbrotos (5.329 microbrotos/g de CN) ocorreram em resposta ao emprego do meio de cultura MSB suplementado com de ANA e 2-iP (2 μ M cada).

Alta eficiência regenerativa (11,3 vezes) e elevado número médio de brotos regenerados por grama de CN inoculada (322,6 brotos/g) também ocorreram em resposta ao emprego do meio de cultura MSB suplementado com 2 μ M de 2-iP (Tabela 2). O modelo quadrático da análise de regressão foi o que melhor descreveu a evolução da eficiência regenerativa e do número médio de microbrotos em resposta ao uso de 2-iP combinado com ANA (Fig. 2A e B). Observou-se também que o 2-iP (2 μ M) suplementado ao meio MSB proporcionou alta taxa regenerativa e maior número de microbrotos, quando comparado com o meio de cultura isento deste fitorregulador (Fig. 2B). Para o fator suplementação de ANA ao meio MSB, o uso de 4 ou 2 μ M deste fitorregulador resultou em maiores taxas médias de regeneração de microbrotos (339,4 e 327,9 brotos/g, respectivamente). Estas taxas regenerativas diferenciam-se significativamente ($p < 0,01$) em relação ao uso do meio de cultura MSB isento ou suplementado com 6 μ M de ANA, após 10 semanas em cultivo (Tabela 3)

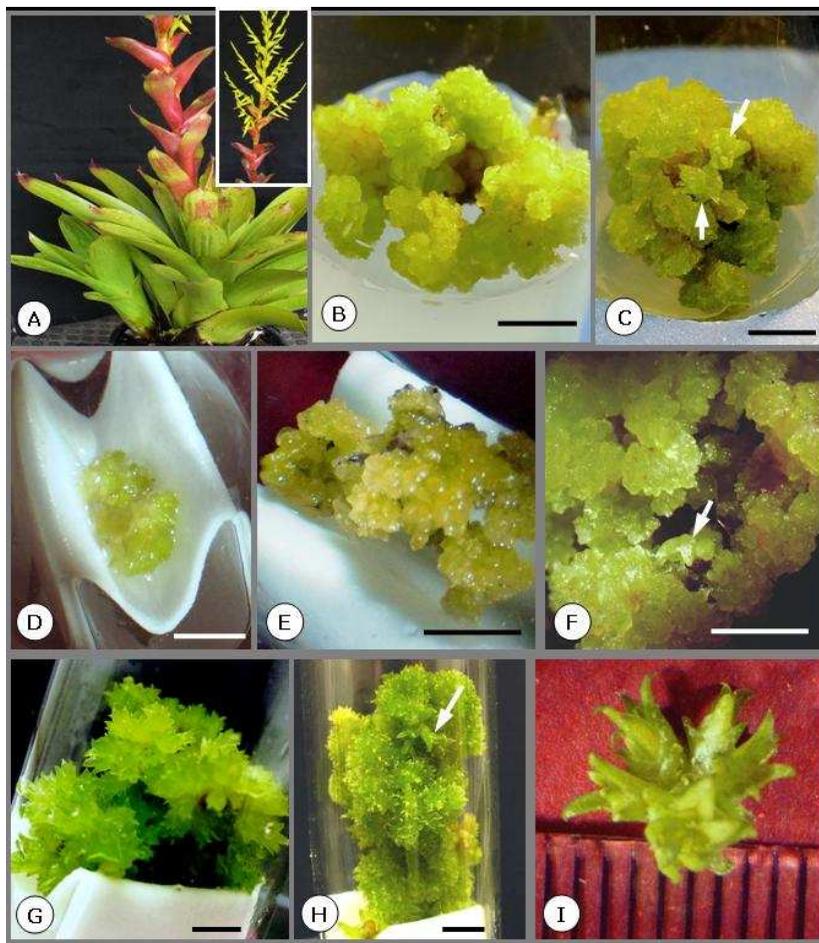


Figura 1. Estabelecimento e multiplicação de culturas nodulares (CNs) e regeneração de microbrotos de *Vriesea reitzii* em meio de cultura MS líquido suplementado com ANA e 2-iP: **A)** Planta matriz, detalhe da inflorescência; **B)** CN de coloração verde amarelada cultivadas em meio de cultura MSB geleificado e isento de fitoreguladores e; **C)** CN com indução de microbrotos; **D)** CNs utilizadas como inóculo para a multiplicação; **E)** Proliferação das CNs após três semanas de cultivo; **F)** Após seis semanas em cultivo, com as CNs de coloração verde e início da indução de microbrotos (setas); **H)** Regeneração múltipla de microbrotos em meios de cultura com ANA e 2-iP ($2 \mu\text{M}$ cada); **G)** Após 10 semanas em cultivo; **H)** Desenvolvimento de microbrotos em grande escala após 21 semanas em cultivo, e; **I)** Detalhe dos microbrotos regenerados com tamanho médio entre 3 a 5mm Barra: = 5mm.

Tabela 1. Eficiência regenerativa de CN de *Vriesea reitzii* em relação à massa fresca inicial e final (g) e o número médio estimado de microbrotos/g de CN inoculada em meio de cultura MS suplementado com ANA (0, 2, 4 e 6 μM) e combinados com de 2-iP (0 e 2 μM), após 10 semanas em cultivo.

Fitorregulador		Massa fresca (g)		Eficiência regenerativa	Total de micro brotos regenerados	Nº estimado de microbrotos/g CN
ANA (μM)	2-iP (μM)	Inicial	Final			
0	0	0,129	1,407	9,9 ($\pm 1,7$)	306,5 (± 25)	2.376 (± 151)
2	0	0,131	1,336	9,2 ($\pm 1,3$)	345,8 (± 42)	2.640 (± 267)
4	0	0,132	1,439	9,9 ($\pm 0,4$)	425,2 (± 38)	3.221 (± 295)
6	0	0,132	1,298	8,8 ($\pm 0,8$)	284,7 (± 92)	2.156 (± 617)
0	2	0,134	1,437	9,7 ($\pm 2,1$)	342,8 (± 74)	2.558 (± 547)
2	2	0,133	1,781	12,4 ($\pm 1,8$)	708,7 (± 82)	5.329 (± 506)
4	2	0,131	1,649	11,6 ($\pm 1,5$)	632,0 (± 32)	4.824 (± 288)
6	2	0,131	1,598	11,2 ($\pm 2,7$)	427,5 (± 88)	3.263 (± 751)
Média		0,132 ($\pm 0,005$)	1,493 ($\pm 0,21$)	10,3 ($\pm 1,5$)	434,1 (± 59)	3.289 (± 428)

* Média de quatro repetições. Valores não significativos segundo a ANOVA. Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial. Média (\pm desvio padrão).

Tabela 2. Eficiência regenerativa das CNs e número médio de microbrotos regenerados/g de CN de *Vriesea reitzii* em resposta ao meio de cultura MS suplementado com 2-iP (0 e 2 μM) após 10 semanas em cultivo.

2-iP (μM)	Eficiência regenerativa	Nº. de microbrotos/g
2	11,3 A	322,6 A
0	9,7 B	247,8 B
Média	10,5	285,2
CV (%)	16,7%	23,4%

Média de quatro repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

Os diferentes potenciais de regeneração de brotos adventícios *in vitro* estão relacionados às características da espécie, ao sistema regenerativo e à composição do meio de cultura (George & Debergh, 2008, Preece, 2008). Assim, considerando a produção de brotos adventícios de *Charybdis numidica*, o maior número de brotos adventícios regenerados/g de CN foi obtido em meio de cultura MS com ANA e BAP (Kongbangkerd et al., 2005). Em *Hovenia dulcis*, altas taxas regenerativas de primórdios caulinares a partir de calos nodulares foram obtidas em meio de cultura MS suplementado com 2-iP. O subsequente desenvolvimento dos microbrotos foi obtido com a

transferência dos mesmos para meio isento de fitorreguladores (Jeong et al., 2009). Em *Sclerocarya birrea* a alta frequência de regeneração de brotos adventícios foi observada a partir de nódulos meristemáticos em resposta ao meio de cultura WPM suplementado com BAP em combinação com ANA, AIB ou AIA (Moyo et al., 2009). Entretanto, em *Daucus carota* subsp. *halophilus*, o incremento do número de brotos regenerados ocorre com o aumento dos níveis de BAP no meio de cultura a partir de calos organogênicos em dois ciclos de cultivo (Tavares et al., 2010).

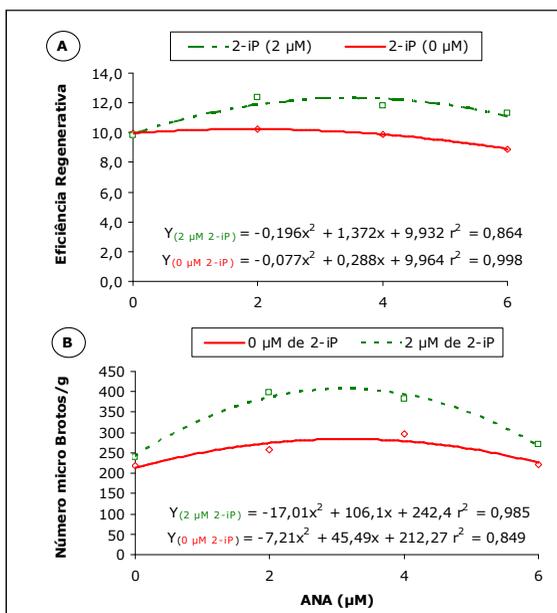


Figura 2. A) Evolução da eficiência regenerativa¹ e; B) Número médio de brotos regenerados/g de CN de *Vriesea reitzii* em resposta ao ANA (0, 2, 4 e 6 μM), suplementado ao meio de cultura MS após 10 semanas de cultivo. Média de quatro repetições. ¹ Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

Alongamento de microbrotos - O alongamento dos microbrotos ocorreu em resposta ao subcultivo para meio de cultura MSB líquido, suplementado com AG₃ (Fig. 3A). O uso de ± 0,2g de CN por tubo de ensaio, sobre ponte de papel filtro, resultou no alongamento sincrônico de brotos após 10 semanas de cultivo (Fig.3A -5, 10 e 15 μM). Por outro lado, o uso do meio MSB isento de AG₃ promoveu uma contínua e sincrônica regeneração de novos microbrotos (Fig. 3A).

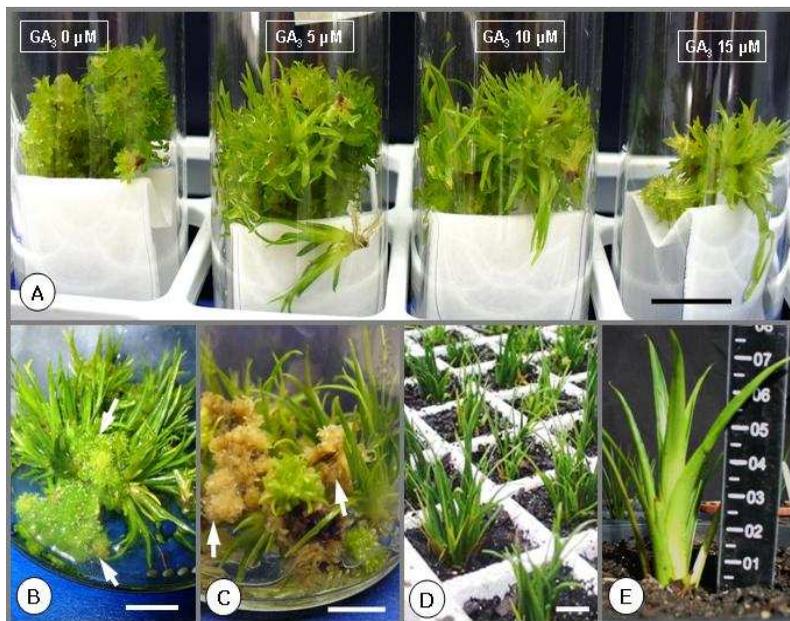


Figura 3. Desenvolvimento de brotos a partir de culturas nodulares (CNs) de *Vriesea reitzii* cultivados em meio MSB líquido suplementado ou não com AG₃: **A)** Regeneração de microbrotos em tubo de ensaio, sobre ponte de papel filtro, em meio MSB líquido isento de AG₃ e alongamento sincronizado de brotos em meio suplementado com 5, 10 e 15 μM de AG₃; **B-C)** Brotos cultivados em frascos de vidro (340 ml) contendo meio líquido: **B)** Alongamento sincrônico dos brotos em meio MSB com 10 μM de AG₃. Observar também a regeneração repetitiva de microbrotos e; **C)** Mortalidade das culturas em meio suplementado com 15 μM de AG₃; **D)** aclimatização das mudas em substrato em bandeja de isopor de 128 células, após cinco semanas e; **E)** Desenvolvimento das mudas em vasos após 20 semanas em ambiente *ex vitro*. Barra: 1 cm.

No ensaio 2 o cultivo em frascos de vidro de 340 ml com uma quantidade de inóculo maior (± 1 g de CN/frasco) resultaram em um intenso desenvolvimento dos microbrotos (Fig. 3B-C). O meio MSB e isento de AG_3 resultou no alongamento dos microbrotos, quando comparado aos resultados obtidos com o uso de tubos de ensaio. Um intenso e sincrônico desenvolvimento de brotos ocorreu em resposta à suplementação ao meio MSB com $10 \mu\text{M}$ de AG_3 (Fig. 3B). Por outro lado, o cultivo dos microbrotos em MSB suplementado com $15 \mu\text{M}$ de AG_3 promoveu maior mortalidade das culturas (Fig. 3C). Além disto, em frascos de vidro e reduzidas quantidades de inóculo parecem ser mais sensíveis as oscilações térmicas da sala de cultivo. Associados a estes eventos, o fator concentração dos fitorreguladores pode potencializar a mortalidade das culturas, tal como foi observada em resposta ao uso de $15 \mu\text{M}$ de AG_3 .

Tabela 3. Taxa de eficiência regenerativa, número médio de microbrotos regenerados/g de CN de *Vriesea reitzii* em resposta ao ANA (0, 2, 4 e 6 μM), suplementado ao meio de cultura MS após 10 semanas em cultivo.

ANA (μM)	Eficiência Regenerativa	Nº. de microbrotos/g
4	10,8 A	339,4 A
2	11,3 A	327,9 A
6	10,1 A	245,3 B
0	9,9 A	228,2 B
Média	10,5	285,2
CV (%)	16,7%	23,4%

Média de quatro repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

A evolução do número médio de brotos alongados, da eficiência regenerativa e da altura média dos brotos dos dois ensaios expressou valores de r^2 significativos. O modelo quadrático foi o mais adequado para explicar a evolução destes dados em respostas aos diferentes níveis de AG_3 , suplementado ao meio MSB (Fig. 4A-B), bem como, das combinações dos diferentes níveis de ANA e de 2-iP suplementados ao meios MSB (Fig. 4C-D).

Observou-se também que o número médio de microbrotos alongados aumentou concomitantemente ao aumento na concentração de AG_3 até $10 \mu\text{M}$ (Fig. 4A). Por outro lado, a eficiência regenerativa medida em massa fresca das CNs diferenciadas somada à massa fresca dos microbrotos regenerados e não alongados, decresceu com o aumento da concentração de AG_3 . Assim, o meio de cultura MSB isento de AG_3

foi o que resultou em eficiência média regenerativa mais elevada (7,3 vezes) (Fig. 4B).

Neste sentido, as derivações das equações e suas projeções teóricas (Fig. 4A) revelam que a produção máxima esperada é de 319 brotos alongados/g de CN em resposta à concentração de 9,8 μM de AG_3 . Portanto, quando os 12,4 g das CNs, obtidas no meio de regeneração são subcultivados neste meio de cultura, podem ser obtidos 3.956 novos brotos alongados após 10 semanas em cultivo. Isto representa uma taxa efetiva de aproximadamente 75% dos microbrotos inicialmente obtidos no meio de cultura de regeneração (5.329 brotos), que podem ser convertidos em brotos, para cada intervalo de 10 semanas de cultivo. Considera-se também que, a partir dos 3.956 brotos alongados e a possibilidade de serem feitas, em média 5,2, subcultivos/ano, isto representa mais de 20.000 brotos/ano para cada gramas de CN inoculada. Um subsequente subcultivo destes brotos em MSB isento de fitorreguladores ou suplementado com AG_3 (5 a 10 μM) resulta em brotos aptos a serem aclimatizados em mais 7 a 8 semanas de cultivo.

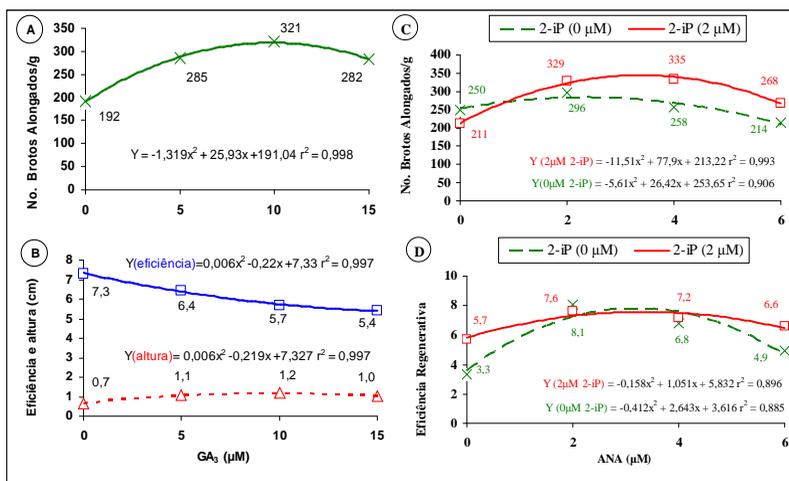


Figura 4. A-B) Evolução da taxa média regenerativa de dois subcultivo a partir de clusters de microbrotos de *Vriesea reitzii* em resposta ao meio de cultura MS suplementado com AG_3 (0, 5, 10 e 15 μM); **A)** Número médio de brotos alongados/g de CN e; **B)** Eficiência regenerativa das culturas nodulares e altura (cm); **C-D)** Evolução da taxa regenerativa de CN em resposta ao meio de cultura de origem, MS suplementado com ANA (0, 2, 4 e 6 μM) combinado com 2-iP (0 e 2 μM), **C)** Evolução do número médio de brotos alongados/g de CN e; **D)** Eficiência regenerativa, 10 semanas em cultivo. * Média de quatro repetições. Eficiência regenerativa = (Massa final – Massa inicial)/Massa inicial.

O alongamento dos brotos produzidos *in vitro* varia consideravelmente para cada espécie de planta. Algumas apresentam brotações que permitem individualizar as microestacas durante os subcultivos ou enraizamento e em outras espécies pelo excesso de ramificações ou dominância, por exemplo, podem apresentar dificuldades de alongamento (George & Debergh, 2008). No presente trabalho, as altas taxas regenerativas e o modelo com base em microbrotos têm demonstrado que o uso de AG₃ nos subcultivos incrementa a taxa de alongamento e reduz o tempo em cultivo. Da mesma forma o uso de AG₃ em meio de cultura MS favoreceu o alongamento dos brotos adventícios de *Melothria maderaspatana* após uma semana de cultivo (Baskaran et al., 2009). A substituição dos fitoreguladores de indução e multiplicação por AG₃ (10 µM) foram necessários para promover o alongamento sincronizado dos microbrotos de *V. splendens* híbrida originados de meios de cultura contendo TDZ (Guerra & Dal Vesco, 2010).

Aclimatização - Brotos alongados e originados dos diferentes meios de cultura MSB suplementados com AG₃ foram aclimatizados com sucesso. Brotos maiores do que 3,5 cm, quando transplantados para uma mistura de substratos comerciais em bandejas de isopor com 128 células, mantidas em túnel com nebulização intermitente mostraram 100% de sobrevivência, independente do tratamento de origem (Fig 3D, dados não mostrados). Mudanças aclimatizadas, quando transplantadas para vasos com o mesmo substrato e mantidas em viveiro com 50% de sombreamento apresentaram um bom desenvolvimento após 20 semanas (Fig. 3E).

Análises histológicas e estruturais – Análises de imagens obtidas em MEV mostraram que as CNs de *V. reitzii* apresentavam-se menos diferenciadas, mantendo, porém alta capacidade regenerativa (Fig. 5A). Observou-se também nestas culturas a indução de nódulos que se aglomeravam em pequenos maciços (Fig. 5B), com características de textura friável, de forma globular e de intensa proliferação conforme descrita na análise morfológica (Fig. 1B-F). Secções destas CNs coradas com azul de Toluidina O revelaram uma intensa proliferação celular, com formação de estruturas nodulares múltiplas (Fig. 5C). Estas estruturas originavam-se a partir de zonas meristemáticas, que evoluíram para nódulos com protoderme definida, após três semanas de cultivo (Fig. 5D).

A permanência destas culturas por seis semanas em cultivos revelou em imagens de MEV, a proliferação de culturas secundárias com textura granular (Fig. 5E). Em outras culturas observou-se também

a formação de nódulos meristemáticos (Fig. 5F) e a formação múltipla de nódulos, diferenciando-se pela organização mais compacta (Fig. 5G). A partir destes nódulos observou-se o desenvolvimento de primórdios foliares (Fig. 5H). Em secções histológicas são observados também neste mesmo estágio de desenvolvimento a organização de meristemas caulinares (Fig. 5I), formando novos aglomerados celulares compostos de células pequenas e isodiamétricas. Subseqüentemente foi observado também o desenvolvimento de meristemas múltiplos evidenciando a diferenciação dos primórdios foliares, após seis semanas em cultivo (Fig. 5J).

Por outro lado, o subcultivo destas CNs em MSB líquido sobre ponte de papel, revelou características específicas de desenvolvimento que determinam a proliferação das CNs até a regeneração de microbrotos. Nas primeiras três semanas de cultivo observa-se em secções histológicas a existência de três diferentes camadas de células: 1) camada central é composta por um grupo maior de células de diferentes tamanhos e não organizadas; 2) na região mais externa um grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas, denominado de zona meristemática e; 3) região externa com a formação da protoderme e a organização de estruturas globulares caracterizada neste trabalho como CN (Fig. 5D). Subseqüentemente, estes processos evoluem para a formação de estruturas globulares múltiplas, seguido da formação de meristemas caulinares e o desenvolvimento da parte aérea, denominadas neste trabalho de microbrotos ou brotos adventícios (Fig. 5K, L). Através de imagem em MEV pode-se observar o início de alongamento dos microbrotos com 8-10 semanas de cultivo (Fig. 5M).

Os eventos estruturais descritos no presente trabalho, também foram observados a partir de análises histológicas em *V. friburguensis* var *paludosa* (Alves & Guerra, 2001), em *V. reitzii* (Alves et al., 2006). Estas características, portanto, se configuram como padrão no gênero *Vriesea* (Guerra & Dal Vesco, 2010). Contudo, no presente trabalho foram utilizados de forma inédita técnicas de MEV para estudar a histodiferenciação das CNs em *V. reitzii*. Neste contexto, os eventos da morfogênese *in vitro* observados nas CNs de *V. reitzii* se assemelham aos observados nos primeiros estádios da embriogênese somática. Assim, no presente trabalho foi possível observar a formação de uma estrutura alongada (Fig. 5I), morfológicamente similar ao coleóptilo característico de monocotiledôneas (Gahan & George, 2008).

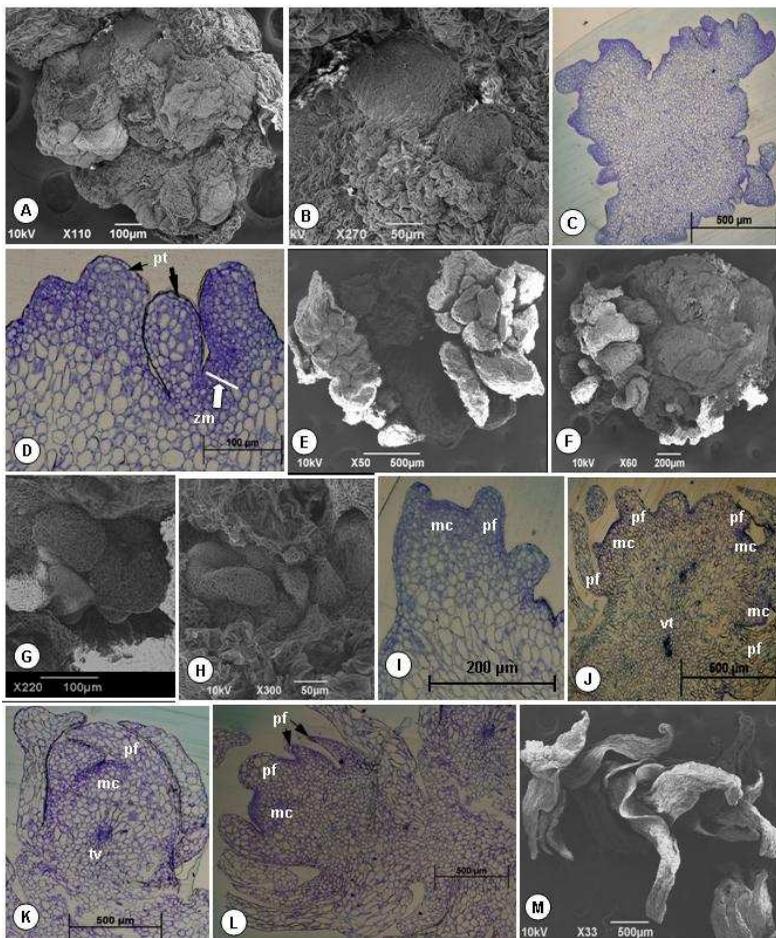


Figura 5. Análise histológica e estrutural de CN de *Vriesea reitzii*: A-B) Imagens em MEV mostrando CN em proliferação: A) CN pouco diferenciada; B) Detalhe do início da formação de nódulos meristemáticos na periferia das CNs; C) Seção de CN friável em proliferação após três semanas em cultivo e; D) Detalhe do grupo de células em proliferação (zona meristemática-seta) e formação nódulos com protoderme definida (setas); E-G) Imagens geradas em MEV mostrando: E) CN em proliferação secundária; F) CN com início de organização de nódulos meristemáticos; G) Detalhe da indução de nódulos múltiplos e; H) Desenvolvimento de primórdios foliares; I-L) Seção histológica mostrando: I) Detalhe da organização de meristemas; J) Desenvolvimento de meristemas múltiplos e diferenciação dos primórdios foliares; K) Desenvolvimento de microbrotos e; L) Diferenciação de microbrotos com 4-5 par de pequenas folhas (setas) e; M) Imagem em MEV mostrando início de alongamento dos microbrotos. **Abreviaturas:** mc - meristema caular; pf- primórdio foliar; zm- zona meristemática, pt-protoderme; tv- tecido vascular.

Contudo, este padrão morfogenético originado das CNs de *V. reitzii* se relaciona com a formação de eixos caulinares monopolares em contraste com o padrão bipolar de formação em embriões somáticos (von Arnold, 2008). Da mesma forma em *Pelargonium x hortorum* a indução de estruturas semelhantes a embriões somáticos de forma globular, porém, em análise histológica não foi observada a característica bipolar e sim somente a formação de meristemas caulinares (Haensch, 2004). Por outro lado, em *D. carota* subsp. *halophilus*, a rota da morfogênese *in vitro* é modificada da organogênese para a embriogênese somáticas, com a indução de calo organogênicos originados a partir da base dos brotos e, de calos induzidos a partir de segmentos de cotilédones quando cultivados em meio de cultura suplementado com BAP e 2,4-D, respectivamente (Tavares et al., 2010).

Os eventos morfogenéticos associados às CNs para outras espécies foram também caracterizados tanto por MEV, quanto por análises histológicas. Tais eventos foram observados em *H. lupulus* (Batista et al., 2000, Forte & Pais, 2000, Forte et al., 2002, 2004), em *Pinus banksiana* (Pelletier & Laliberté, 2000), em *Eucalyptus globulus* (Trindade & Pais, 2003), na bromélia *Tillandsia eizii* (Pickens et al., 2006), em *Amorphophallus albus* (Hu & Li, 2008), em *Populus euphratica* (Ferreira et al., 2009) e em *Sclerocarya birrea* (Moyo et al., 2009).

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que as CNs de *V. reitzii* se configuram morfogeneticamente em uma rota regenerativa *in vitro* intermediária entre a organogênese e a embriogênese somática. Este modelo *in vitro* apresenta elevado potencial regenerativo para a propagação em larga escala de bromélias ornamentais e/ou ameaçadas de extinção, como é o caso de *V. reitzii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, G.M. & Guerra, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. **J. . Bomeliad Soc.**, v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- Alves, G.M.; Dal Vesco, L. L. & Guerra, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Hort.** v.110, p.204–207, 2006.
- Aranda-Peres, A.N.; Rodriguez, A.P.M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). **Floriculture, ornam. plant biotech.**, 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006, v.4, pp. 644-655.
- Baensch, U., Baensch, U. Blooming Bromeliads. Hagen Books, Mansfield, Massachusetts, 1994, 270 pp.

- Baskaran, P.; Velayutham, P.; Jayabalan, N. In vitro regeneration of *Melothria maderaspatana* via indirect organogenesis. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.**, v.45, p.407-413, 2009.. DOI 10.1007/s11627-008-9172-8
- Batista, D., Ascensão L., Sousa, M. J., Pais, M. S. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Sci.**, v.151, p. 47-57, 2000.
- Benzing, D.H. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 2000.
- Compton, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.37, p.217-242, 1994.
- Ferreira, S.; Batista, D. Serrazina, S. Pais, M. S. Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 96, p.35-43, 2009.
- Firoozabady, E. & Mo, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.40, p.67-74, 2004.
- Fortes, A. M. & Pais, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content. **Am. J. Bot.**, v. 87, n. 7, p. 971-979, 2000.
- Fortes, A. M., Testillano, P. S. Risueño, M. Del C., Pais, M. S. Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. **Physiol. Plant.**, v. 116, p.113-120, 2002.
- Gahan, P.B. & George. E.F. **Adventitious Regeneration**. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ª. Edição, Springer, pp.355-401, 2008.
- Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. Atlantic Forest hotspot status: an overview. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.), **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook**. CABS and Island Press, Washington, 2003, pp. 3-11.
- George, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1, 2 ed. Exegetics: Edington, 1993, 574 p.
- George, E.F., Debergh, P.C. Micropropagation: Uses and Methods. . In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ª. Edição, Springer, 2008, pp. 29-64.
- Giridhar, P.; Kumar, V.; Ravishankar, G. A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.40, p.567-571, 2004.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, 2010., pp.47-66.
- Haensch, K.-T. Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium hortorum* Bailey. **Plant Cell Rep.** v. 22, p.376-381, 2004.
- Heywood, V. H. **Global Biodiversity Assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 1140p.

- Hu, J. Li, J. Morphogenetic pathway in petiole derived callus of *Amorphophallus albus* in vitro. **Acta Physiol Plant**, v.30, p.389-393, 2008.
- Jeong M.J., et al. High frequency plant regeneration following abnormal shoot organogenesis in the medicinal tree *Hovenia dulcis*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 98, p. 59-65, 2009.
- Kongbangkerd, A.; Köpf, A.; Allacher, P. Wawrosch, C.; Kopp, B. Micropropagation of squill (*Charybdis numidica*) through nodule culture. **Plant Cell Rep**, v.23, p.673-677, 2005.
- Leme, E.M.V. and Costa, A. A new species from Southern Brazil, a tribute to Father Raulino Reitz. **J. Bromeliad Soc.** 41, 195-198, 1991.
- Lu, C.-Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** v.29, p.92-96, 1993.
- Luther, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 2008. 114p.
- Martinelli, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific Am.**, v. 282, p. 86-93, 2000.
- Morel, G.M. & Wetmore, R.H. Tissue culture of monocotyledons **Am. J. Bot.**, 38:138-140, 1951.
- Moyo, M., Finnie, J.F. van Staden, J. *In vitro* morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v.98, p.273-280, 2009.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497. 1962.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- Paek, K.Y., Chakrabarty, D., Hahn, E.J Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.81, p. 287-300, 2005.
- Pelletier, G., Laliberté, S. Effect of embryo orientation on the developmental sequence of adventitious organogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). **Can. J. Bot.** v.78, p.1348-1360, 2000.
- Pickens, K.A.; Wolf, J.; Affolter, J.M.; Wetzstein, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v.42, p.348-353, 2006.
- Preece, J. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3^a. Edição, Springer, pp. 403-422, 2008.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L. Nodari, R.O. Lischka, R.W. Müller, C.V.; Guerra, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiv. Conserv.**, v.14, p.1799-1808, 2005.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco L.L.; Guerra, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.909-912, 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.

- Reitz, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica.** (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues. 1983, 559p.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F., Hirota, M.M., Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biolog. Conserv.**, v.142, p. 141-1153, 2009.
- Shriram, V.; Kumar, V.; Shitole, M.G. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. **In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant**, v.44, p.186-193, 2008.
- Tavares, A.C., Salgueiro, L.R., Canhoto, J.M. In vitro propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.**, v.46, p.47-56, 2010.
- Teng, W.L. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. **Plant Cell Rep.** v.16, p.454-457, 1997.
- Trindade, H., Pais, M.S. Meristematic nodule culture: a new pathway for in vitro propagation of *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v.17, p.308-315, 2003.
- von Arnold, S. Somatic Embryogenesis In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). **Plant Prop. Tiss. Cult.** 3^a. Edição, Springer, 2008. pp. 335- 354.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sistema regenerativo em *B. zebrina* - Os resultados obtidos com esta espécie mostram que o sistema regenerativo *in vitro* baseado na indução, proliferação e desenvolvimento de CN é o primeiro descrito para esta bromélia. Esta espécie, ademais de sua importância ecológica no seu ecossistema natural, apresenta grande potencial ornamental.

O sistema regenerativo *in vitro* baseado na indução e desenvolvimento de culturas nodulares possibilitou a manutenção das culturas com baixo nível de diferenciação por longo tempo e mostra elevada eficiência regenerativa com vistas à propagação massal. Este sistema apresenta também alto potencial para servir como modelo de estudo de histodiferenciação, desenvolvimento e regeneração de brotos e para a conservação *in vitro* e/ou criopreservação da espécie.

As diferenças morfológicas das culturas nodulares estão associadas, especificamente, a cada tipo, concentração e combinação de fitorregulador utilizado no meio de cultura.

A integração do sistema de regeneração *in vitro* baseado em culturas nodulares com a análise da genética molecular usando a técnica de AFLP mostrou-se eficaz. A reprodutibilidade, o elevado nível de polimorfismo detectado e a grande quantidade de fragmentos do genoma fazem desta técnica uma ferramenta robusta para a análise da diversidade genética visando à conservação *in situ* e *ex situ* e/ou a comprovação da fidelidade clonal, dependendo dos objetivos a serem alcançados.

Sistema regenerativo em *V. reitzii* - O sistema regenerativo desta espécie mostrou ser de alta eficiência. Pode ser aplicado para a regeneração *in vitro* de bromélias em larga escala ou para a conservação *in vitro* desta bromélia ameaçada de extinção e com alto potencial ornamental. Além disto, é um modelo para estudos histológicos e anatômicos da histodiferenciação de cultura nodulares.

Os diferentes padrões morfogenéticos e taxas de indução e proliferação das CNs observados a partir de sementes e bases foliares de *V. reitzii* estão associados, especificamente, aos tipos, concentrações e combinações de cada fitorregulador testado, bem como às condições de cultivo.

Um processo regenerativo de CN eficiente para *V. reitzii* associados ao uso do meio de cultura MSB suplementado com ANA e 2-iP (2 μ M cada) resulta em 12,4 g/g de CN. Através de projeções desta eficiência associadas ao subcultivo destas 12,4 g de CN em MSB suplementado com AG₃ (10 μ M), podem ser obtidos mais 3.900 brotos alongados após 10 semanas de cultivo. Isto representa uma eficiência de

75% de brotos alongados dos mais de 5.300 microbrotos/g de CN obtidas na etapa de regeneração. Considerando também a ocorrência de 5,2 subcultivos/ano, podem ser obtidos mais de 20.000 brotos alongados/ano por grama de CN inoculada.

Com base nas avaliações estruturais pode-se comprovar que as CNs se configuram em uma rota regenerativa *in vitro* intermediária entre a organogênese e a embriogênese somática. Este sistema apresenta alta eficiência regenerativa e baixo custo.

Portanto, este modelo morfogenético, associado as ferramentas moleculares, tal como, o uso de marcador AFLP para a comprovação da fidelidade clonal, pode ser empregado em sistema biofábricas para a produção de mudas em grande escala de bromélias de interesse ornamental ou de conservação.

9. LISTA DE PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DO DOUTORADO

Ao longo do período de doutorado o autor desta tese participou da co-autoria de várias publicações na temática específica da tese ou em temas correlatos, conforme a lista abaixo:

- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press-Springer, 2010. v.589, pp.47-66, 400p. doi:10.1007/978-1-60327-114-1_6.
- Rech Filho, A.; Dal Vesco, L.L.; Guerra, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic forest. **Ciência Rural** v.39, n.3, p.909-912, 2009. doi:10.1590/S0103-84782009005000024.
- Sandoval-Yugar, E.W., Dal Vesco, L.L., Steinmacher, D.A., Stolf, E.C., Guerra, M. P. Microshoots encapsulation and plant conversion of *Musa sp.* cv. 'Grand Naine'. **Ciência Rural**. v.39, n.4, p.998-1004, 2009. doi:10.1590/S0103-84782009005000024.
- Cangahuala-Inocente, G. C.; Dal Vesco, L. L.; Steinmacher D.A., Guerra, M. P. Somatic embryogenesis in pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg): Induction, Conversion and Artificial Seeds. **Scientia Horticulturae** v.111, p. 228–234, 2007.
- Dal Vesco, L.L.; Ribeiro, R.J.; Guerra, M.P. Otimização da micropropagação de bromélias ornamentais em sistema biofábrica. **Rev. Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, Suplemento, p.725-728, 2007.
- Dal Vesco, L.L.; Jacomel Júnior, N.; Caprestano, C.A.; Holderbaum, D.F.; Guerra, M.P. Micropropagação de lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia Emeric ex Loiseleur*). **Rev. Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, Suplemento, p.716-720. 2007.