

Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae

André Luís Lopes da Silva¹, Elci Terezinha Henz Franco², Eduardo Bortoluzzi Dornelles²
& João Pedro Arzivenko Gesing²

¹ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, CEP 80035-050, Curitiba, PR, Brasil.
clonageinvitro@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Biologia, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido em 24.XI.2005. Aceito em 04.I.2008

RESUMO – Bromélias do gênero *Dyckia* são terrestres e ornamentais. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para micropropagação de *D. maritima*. Sementes germinadas *in vitro* produziram plântulas que foram cultivadas em meio MS suplementado com combinações de BAP (6-Benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico). As plantas formaram protuberâncias na região basal após 60 dias, sendo subcultivadas nas mesmas concentrações anteriores de BAP contendo 0,5 µM de AIB, o que promoveu a indução de gemas laterais. As gemas laterais foram excisadas das plântulas doadoras e subcultivadas em meio MS suplementado com BAP ou KIN (6-furfurilaminopurina). Os melhores resultados para a multiplicação de gemas em resposta aos dois reguladores de crescimento foram obtidos na concentração de 2,0 µM. Os brotos foram enraizados em meio MS contendo 0,5 µM de AIB apresentando 33% de enraizamento após 60 dias. Os clones foram aclimatizados em substrato constituído de solo, areia e vermiculita (1:1:1), resultando em 90% de sobrevivência.

Palavras-chave: bromélias; cultura de tecidos; organogênese direta; propagação *in vitro*.

ABSTRACT – **Micropropagation of *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae.** Bromeliads of the genus *Dyckia* are terrestrial and ornamental. The aim of this work was to establish a protocol for micropropagation of *D. maritima*. Seeds germinated *in vitro* produced plantlets that were cultured on MS medium supplemented with a combination of BAP (6-benzylaminopurine) and IBA (indole-3-butyric acid). The plantlets formed protuberances at the basal region after 60 days. Lateral buds were formed during subculture to medium supplemented with the same BAP concentration plus 0.5 µM IBA. The lateral buds were excised and subcultivated on MS medium supplemented with BAP or KIN (6-furfurylaminopurine). The best multiplication rates obtained with both growth regulators were found at the concentration of 2.0 µM. The shoots were rooted on MS medium supplemented with 0.5 µM IBA, with 33% of efficiency. The clones were acclimatized in a substrate constituted of soil, sand and vermiculite (1:1:1), with 90% of survival.

Key words: bromeliads, tissue culture, direct organogenesis, *in vitro* propagation.

INTRODUÇÃO

Bromélias são freqüentemente propagadas por sementes ou por divisão de brotos laterais, porém tais métodos convencionais não são apropriados para a produção massal requerida para as espécies ornamentais (Carneiro *et al.*, 1999). A propagação vegetativa de bromélias é muito lenta, uma vez que poucos brotos laterais são produzidos por planta (Koh & Davies, 1997). Na reprodução por sementes, as desvantagens são a produção limitada (Daquinta *et al.*, 1999) e a necessidade de utilização periódica de fungicidas durante a germinação, tendo em vista que esse é o período de maior suscetibilidade a doenças.

A propagação *in vitro* tem demonstrado grande potencial em relação às técnicas convencionais como redução do tempo, espaço e custos (Grattapaglia & Machado, 1999), além de permitir a obtenção de um grande número de plantas geneticamente homogêneas (Droste *et al.*, 2005).

Os explantes utilizados nos protocolos de micropropagação de bromélias são variados. Plântulas *in vitro* foram usadas como material inicial, em algumas espécies de *Tillandsia* Linnaeus (Mekers, 1977; Koh & Davies, 2001) e em *Dyckia distachya* Hassler (Pompelli & Guerra, 2005). Alternativamente, outras fontes de explantes foram usadas, como folhas (Mercier & Kerbauy, 1992), estolões (Carneiro *et al.*,

1999) meristemas intercalares (Koh & Davies, 1997) e brotos estiolados (Pereira *et al.*, 2001).

Em seus estudos com *Ananas comosus* (L.) Merrill, Panneter & Lanaud (1986) *apud* Pescador & Koller (1992), estimaram que, em apenas dois anos, é possível a produção de dois milhões de plantas, a partir de uma única gema. Esta observação serve como indicativo de que a técnica de cultura de tecidos vegetais pode ser empregada com sucesso para a propagação massal de bromélias, permitindo assim a conservação de germoplasma e o atendimento à demanda do consumo paisagístico.

Dyckia maritima Baker é uma bromélia terrestre, ornamental e provida de numerosas folhas dispostas em roseta, com flores amarelo-alaranjadas arranjadas em uma inflorescência de 1-2,5 m de altura. A distribuição geográfica abrange o sul do estado de Santa Catarina e a parte leste do estado do Rio Grande do Sul (Reitz, 1983). De acordo com a lista das espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul (RS), existem 102 espécies de bromélias ameaçadas, sendo 24 do gênero *Dyckia* Schultes filius (Sema, 2006). Este fato é devido principalmente à destruição de seus habitats (Alves, 2000) e à extração intensiva e indiscriminada para atender à demanda crescente de mercado (Carneiro *et al.*, 1999). O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para micropropagação de *D. maritima*.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Dyckia maritima* foram coletadas de plantas localizadas no Jardim Botânico da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria), no mês de março de 2004. As sementes foram armazenadas a temperatura ambiente, em sacos de papel e utilizadas 45 dias após a coleta.

As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool 70% durante 15min e, em seguida, enxaguadas duas vezes com água bidestilada e autoclavada. Posteriormente as sementes foram imersas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio (3% de cloro ativo) acrescida de algumas gotas de detergente neutro, durante 1h e 30min, e novamente enxaguadas duas vezes em água bidestilada e autoclavada. As sementes foram inoculadas em meio de cultura constituído de água destilada solidificada com 6 g L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,7.

Plântulas obtidas após 25 dias foram transferidas para meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com re-

dução de 50% dos sais, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de agar e os tratamentos foram: (1) 2,2 e 2,4 (2) 4,4 e 4,9 (3) 13,3 e 14,7 μM de BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico), respectivamente, além de um controle sem reguladores de crescimento. Aos 60 dias, as plântulas foram subcultivadas para o meio MS contendo 100% dos sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de agar, 0,5 μM de AIB e submetido aos tratamentos: 0; 2,2; 4,4; ou 13,3 μM de BAP. A percentagem de plântulas que formaram protuberâncias e a percentagem de plântulas que formaram gemas laterais foram avaliadas após 30 dias.

As gemas laterais obtidas nos cultivos anteriores foram transferidas para meios suplementados com BAP ou KIN (cinetina), nas concentrações de 0; 0,5; 1,0 ou 2,0 μM. O meio basal utilizado foi MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 ml L⁻¹ de vitaminas Fugi (2,5 g L⁻¹ de ácido nicotínico, 2,5 g L⁻¹ de cloridrato de piridoxina, 0,5 g L⁻¹ de cloridrato de tiamina, 50 g L⁻¹ de inositol e 1 g L⁻¹ de glicina) e solidificado com 6 g L⁻¹ de agar. O número de brotos por grama de inóculo (quociente entre o número final de brotos e a massa fresca inicial) e o número de gemas por grama de inóculo (quociente entre o número final de gemas e a massa fresca inicial) foram avaliados após 40 dias de cultivo.

Os brotos regenerados nos agrupamentos de protuberâncias foram isolados e cultivados em meio MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 mL L⁻¹ de vitaminas Fugi, 0,5 μM de AIB e solidificado com 6 g L⁻¹ de agar. Após 60 dias foram avaliadas a percentagem de enraizamento, a percentagem de sobrevivência, a percentagem de formação de brotos laterais, a média do número de brotos laterais e a média do número de raízes formadas por planta.

Os brotos enraizados foram removidos das condições *in vitro* e suas raízes foram lavadas com água destilada para a remoção dos resíduos do meio de cultura. As plantas foram cultivadas em copos plásticos contendo um substrato composto por solo, areia e vermiculita (1:1:1), permanecendo por 60 dias dentro de caixas plásticas acondicionadas em sala de crescimento. Posteriormente as caixas foram transferidas para um telado com redução de 50% da intensidade luminosa com o uso de Sombrite® e mantidas por 30 dias. Após este período (90º dia do período de observação), o sombrite foi removido, e as plantas permaneceram expostas a radiação solar por 30 dias, totalizando 120 dias de avaliação.

Todos os meios de cultura, incluindo o substrato usado para a aclimatização foram autoclavados por 15 min a 121° C e 103 KPa. Os experimentos realizados *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento com a temperatura de 25°C ± 2 e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 20 µM m⁻² S⁻¹, obtida de lâmpadas fluorescentes brancas.

O delineamento usado foi blocos ao acaso, com 25 repetições e cada unidade experimental constou de uma única estrutura (plântulas ou agrupamentos de estruturas morfogênicas). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes teve início quatro dias após a inoculação, com uma eficiência de 100%. A parte alada da semente não foi removida, o que pode ter influenciado a alta taxa de sobrevivência das sementes e a alta taxa de contaminação (dados não apresentados). A região alada da semente é uma região de difícil descontaminação e pode também ter protegido o embrião contra os agentes desinfestantes resultando em uma eficiência de desinfestação de 74%.

O processo de indução de gemas laterais ocorreu em duas fases distintas: na primeira ocorreu a formação de protuberâncias na região basal das plântulas e na segunda houve a indução de gemas a partir dessas estruturas. As combinações utilizadas de BAP e AIB promoveram a formação de protuberâncias em 30% das plântulas, após 60 dias. Os tratamentos com as concentrações testadas não apresentaram diferenças estatísticas (P = 0,05), porém na ausência destes reguladores de crescimento (controle) não foi observada formação de protuberâncias. No subcultivo, com a redução do AIB para 0,5 µM, houve a formação de gemas laterais após 30 dias, em cerca de 30% das plântulas. Resultados

similares foram observados em plântulas de *Vriesea fosteriana* L. B. Smith após um mês de cultivo, em que todos os tratamentos usados induziram a formação de protuberâncias, sendo a melhor resposta obtida na combinação de 2,7 µM de ANA com 8,9 µM de BAP (Mercier & Kerbauy, 1992).

O processo de indução de gemas laterais em *Dyckia maritima* foi menos eficiente que o observado em *D. distachya*, provavelmente devido ao tipo de material inicial utilizado (Pompelli & Guerra, 2005). Enquanto que em *D. maritima* foram utilizadas plântulas com 25 dias e em *D. distachya* foram usadas sementes, as quais podem originar mais do que uma brotação a partir de um único embrião quando germinadas em meio suplementado com citocininas (Fischer & Zimmer, 1988).

Na multiplicação de gemas laterais, os melhores resultados com KIN e BAP foram obtidos com 2,0 µM (75 e 55 gemas por grama de inóculo, respectivamente), sendo os resultados obtidos com KIN significativamente superiores àqueles encontrados com BAP (Tab. 1). Na regeneração de brotos os dados obtidos com KIN também foram superiores aos encontrados com BAP (Tab. 1). Os meios suplementados com 1,0 e 2,0 µM de BAP não induziram a regeneração de brotos. Por outro lado, o cultivo na presença de BAP a 0 e 0,5 µM resultou na produção de 18 e 24 brotos por grama de inóculo, respectivamente.

Os brotos isolados dos agrupamentos de estruturas morfogênicas cultivados em meio suplementado com 0,5 µM de AIB apresentaram um percentual de 33,3±16% de enraizamento, e uma média de 1,4±1 raízes por planta com um índice de 86,6±7% de sobrevivência. A percentagem de plântulas que produziram brotos laterais foi 46,6±16% e uma média de 2,3±1,5 brotos por planta. A formação de brotos laterais possivelmente deve-se ao nível endógeno de citocininas originado do cultivo anterior (meio de multiplicação) e pode ser responsável pela baixa taxa de enraizamento (33%), sugerindo que não houve o

TABELA 1 – Efeitos do BAP e KIN na multiplicação *in vitro* de estruturas morfogênicas de *D. maritima* após 40 dias.

	BAP (µM)				KIN (µM)			
	0	0,5	1,0	2,0	0	0,5	1,0	2,0
Gemas.g ⁻¹	32 c ¹	30 c	35 c	55 b	32 c	60 b	58 b	75 a
Brotos.g ⁻¹	17 b	24 b	0 c	0 c	17 b	40 b	35 b	55 a

* Letras iguais, na horizontal não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

retorno da dominância apical nas plântulas. Em *V. fosteriana* foi necessário à adição de 0,54 µM de ANA para promover o retorno da dominância apical nas plântulas, o que favoreceu o processo de enraizamento (Mercier & Kerbauy, 1992).

O período de observação durante a aclimatização de *D. maritima* foi de 120 dias, resultados concordantes foram encontrados em clones de *D. distachya* obtidos por organogênese direta, que também necessitaram de 120 dias de observação (Pompelli & Guerra, 2005). Quando não houve mais diminuição no percentual de sobrevivência, os clones foram considerados aclimatizados (dados não apresentados). Em *D. distachya*, a aclimatização foi realizada com o uso de um substrato constituído de turfa, areia e vermiculita (2:2:1) (Pompelli & Guerra, 2005). Esta mesma constituição de substrato foi usada para *Dyckia macedoi* L. B. Smith, porém em proporções diferentes (1:1:1) (Mercier & Kerbauy, 1993). Quanto à composição do substrato utilizado para *D. maritima* a única diferença com relação a estes substratos foi a substituição da turfa por solo, porém essa diferença não afetou a sobrevivência dos clones, considerando que em *D. distachya* foi obtido 92,6% de sobrevivência dos clones (Pompelli & Guerra, 2005) e 90% em *D. maritima*.

As plântulas usadas como explantes nestes experimentos permitem a obtenção de clones a partir de diferentes genótipos, o que mantém variabilidade genética entre os clones, com impactos positivos sobre sua conservação (Pompelli & Guerra, 2005). Durante a formação das gemas laterais, também houve a formação de gemas albinas. Essa alteração deve-se, provavelmente, a uma variação epigenética, já que quando essas gemas foram multiplicadas houve o reaparecimento da pigmentação verde. Resultados semelhantes foram obtidos em *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Koh & Davies, 2001). Os resultados destes experimentos demonstram a viabilidade da técnica de micropropagação para a produção massal e conservação de germoplasma *in vitro* da espécie *D. maritima*, o que pode resultar num suprimento suficiente de mudas para a indústria de bromélias e como ferramenta acessória para a conservação desta espécie. Este protocolo de micropropagação também pode ser utilizado para o desenvolvimento de novos estudos, tais como a indução de poliploidia e mutagênese *in vitro*, as quais podem ser de extrema relevância para promover o melhoramento genético dessa espécie a fim de aumentar o seu potencial ornamental.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.M. 2000. **Micropropagação e conservação de *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa***. 97f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. 1999. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 55, p. 79-83.
- CRUZ, C. D. 2001. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária. 648p.
- DAQUINTA, M.M.; ALMEIDA, A.; GUERRA, M.P. 1999. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of Bromeliad Society**, v. 49, n. 2, p. 72-76.
- DROSTE, A.; DA SILVA, A.M.; MATOS, A.V.; DE ALMEIDA, J.W. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722.
- FISCHER, G.; ZIMMER, K. 1988. Regeneration of germinating seeds *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 226, p. 615-618.
- GRATTAPAGLIA, D.E.; MACHADO, M.A. 1999. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. p.183-260.
- KOH, Y.C.; DAVIES, F.T.J. 1997. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horticulturae**, v. 70, p. 301-307.
- KOH, Y.C.; DAVIES, F.T.J. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 225-240.
- MEKERS, O. 1977. *In vitro* propagation of some *Tillandsioideae* (Bromeliaceae). **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 311-317.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. 1992. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 247-249.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. 1993. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, v.1, n. 6, p.70-72.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497.
- PEREIRA, F.D.; BRAGA, M.F.; SÁ, M.E.L.; ALCINO, O.A.G.; COLENGHI, I.C. 2001. Influência de BAP e NAA na multiplicação de abacaxi cv. Perolera a partir de brotos estiolados *in vitro*. **BioScience Journal**, v. 17, n. 2, p. 46-60.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O.C. 1992. Propagação “*in vitro*” do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, n. 2, p. 1-4.
- POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 117-124.
- REITZ, R. 1983. **Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica**. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, n. brom, p. 1-808.
- SEMA. 2006. **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/especextrs1.htm>. Acesso em 10 jul. 2006.