

Ajuste de protocolo para propagação *in vitro* para os clones 01, 04 e 08 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.

Manfio, Candida Elisa¹; Carvalho, Mychelle²; Moura, Elisa Ferreira¹; Valente, Magno Sávio F₃; Motoike, Sérgio Y⁴.

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFV-MG), email: cemanfio@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (UFV-MG), email: mcarv78@yahoo.com.br; ³ Estudante de Graduação em Agronomia (UFV-MG); ⁴ Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia (UFV-MG), email: motoike@ufv.br.

INTRODUÇÃO

A espécie *O. grossiorum* apresenta grandes atributos ornamentais que podem ser potencialmente explorados, pois é de pequeno porte, fácil manejo, rústica, de fácil adaptação, com inflorescência duradoura, cerca de seis meses, dentre outros. Contudo, a mesma não é cultivada comercialmente por não haver técnicas agronomicamente definidas para a sua exploração em escala comercial. Essa espécie é endêmica da Mata Atlântica e encontra-se em perigo de extinção (Leme e Paula, 2003), o que aumenta a necessidade de estudos envolvendo sua conservação.

A biotecnologia pode auxiliar na conservação desta espécie por meio da produção de mudas de qualidade através das técnicas de cultivo *in vitro*, a qual pode ser aplicada tanto para propagação sexuada como para a assexuada. Na propagação sexuada a técnica de cultivo *in vitro* propicia melhor, e por consequência maior germinação das sementes, permitindo a obtenção de maior número de plantas. Na propagação assexuada ou vegetativa, a cultura *in vitro* pode propiciar a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, além de permitir a multiplicação rápida e geneticamente confiável de clones (Guerra et al., 1999). Entretanto, a resposta *in vitro* varia grandemente em função do genótipo e das condições de cultivo *in vitro*.

Portanto, para o sucesso da propagação vegetativa *in vitro* é fundamental que clones selecionados respondam a estímulos aplicados em ambiente *in vitro*, especialmente, a reguladores de crescimento. A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo, em particular, as citocininas, é indispensável para a quebra da dominância apical e indução de gemas axilares. A 6-benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina sintética muito utilizada em cultura de tecidos vegetais, por sua alta eficiência na promoção de multiplicação em diversas espécies (Ziv, 1991).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para propagação *in vitro* para os clones 01, 04 e 08 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.

METODOLOGIA

Os clones 01, 04 e 08 selecionados quanto ao seu potencial ornamental em experimento anteriormente realizado foram resgatados dos estoques mantidos *in vitro* no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais - UFV. O experimento foi montado a partir das brotações destes propágulos, de tamanho uniforme e sem raízes. Neste experimento foram testados cinco níveis de BAP (0, 10, 20, 30 e 40 μM), em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, onde a unidade experimental era constituída de um frasco contendo dois explantes, em meio MS líquido. O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$, antes da esterilização à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 350 ml, com dimensão de 50x140 mm, contendo 20 ml de meio de cultura. Os explantes foram incubados em sala com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Após 60 dias de incubação as características avaliadas foram: comprimento médio de brotações, número de brotações por propágulos, porcentagem de brotações com formação de raízes, porcentagem de brotações com formação de calo e porcentagem de brotações deformadas.

Os resultados, dos três clones obtidos foram analisados separadamente, com o objetivo de ajuste de protocolo para cada clone. Estes resultados foram submetidos à análise de variância e suas médias ajustadas à regressão.

As análises estatísticas foram obtidas utilizando-se o Programa Computacional "GENES" (Cruz, 2001).

Para as características brotações com formação de raízes, brotações com formação de calos e brotações deformadas, foi realizada análise descritiva baseada na ausência e presença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho observou-se que clones de *O. grossiorum* respondem à presença de BAP no meio de cultura, confirmando a seleção feita em experimento anterior, onde se selecionou previamente clones que respondiam ao BAP emitindo brotações, contudo esta resposta é dependente do genótipo estudado. Para todos os Clones a concentração em que se obteve o maior número de brotos por propágulo foi 10µM de BAP (Figura 1). Em concentrações elevadas de BAP observou-se efeito antagônico do regulador de crescimento no número de brotações o que pode ser atribuído a sua fitotoxicidade ao vegetal (Leshem et al., 1988). A formação de raízes foi observada somente no tratamento sem a adição de BAP. O efeito inibitório da adição do BAP na formação de raízes é bastante conhecido, sendo atribuída à alteração da relação auxina/citocinina. A presença de BAP no meio de cultivo também inibiu a formação de raízes em *A. strobilacea* e *Q. quesneliana* (Figueiredo, 2003) e *A. imperialis* (Naves, 2001).

A formação de calos foi observada somente no Clone 08, em presença de BAP. A formação de calos tem sido relacionada à maior ocorrência de variações somaclonais; no presente trabalho a maioria dos clones selecionados não formaram calos quando multiplicados *in vitro*. Para estes clones o risco de variação somaclonal é menor do que no Clone 08, onde se observa a formação de calos mesmo nas menores concentrações estudadas de BAP. Para este clone há necessidade de se estudar concentrações menores de BAP para anular a formação de calos e otimizar a sua multiplicação. Estudos neste sentido se encontram em andamento no LCCTV. O uso de citocinina estimula maior produção de parte aérea, o excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. A toxidez por citocinina no meio se caracteriza, principalmente, pelo excessivo entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada, com conseqüente dificuldade na etapa de enraizamento (Leshem et al., 1988). Estes autores relacionaram o processo de hiperidricidade em culturas de crisântemo e melão com toxidez de BAP. Segundo Jain et al. (2001), a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo proporciona o desenvolvimento de maiores freqüências de plantas normais, enquanto o meio suplementado com BAP leva ao desenvolvimento de hiperidricidade. Este fenômeno pode ser controlado, até certo ponto, pela redução ou exclusão do BAP do meio.

CONCLUSÕES

- O aumento gradativo das concentrações de BAP afetou o comprimento médio de brotações de todos os clones avaliados;
- O número máximo de brotações por explante varia nas concentrações de BAP de acordo com o Clone avaliado;
- A formação de calos foi observada somente no Clone 08, em presença de BAP;
- Em concentrações elevadas de BAP foram observadas brotação má formadas somente no Clone 05;
- Os protocolos desenvolvidos poderão ser utilizados como base para estabelecimento de metodologias de conservação *in vitro*, podendo também ser aplicados em programas de reintrodução e produção massal de mudas para a comercialização, o que pode suprir o mercado com uma bromélia apropriada para uso em interiores e jardins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUZ, C. D. Programa GENES-versão Windows. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p. 2001.

FIGUEIREDO, M. L. Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de bromeliaceae nativas do Brasil. Dissertação (MS). UFV. 2003. 57p.

GUERRA, M. P.; DAL.; L. L. PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1557-1563, 1999.

JAIN, A.; KANTIA, A.; KOTHARI, S. L. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. **Scientia Horticulturae**, 87:319-326, 2001.

LEME, E. M. C.; PAULA, C. C. Uma nova espécie de *Orthophytum* de Minas Gerais, Brasil. **Vidalia** 1 (1): 1-5, 2003.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P.: The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany** 62: 271-276. 1988.

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

NAVES, V. C. propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms. Dissertação (MS). UFLA, 2001. p. 76.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) **Micropropagation: Technology and Applications**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

PALAVRAS-CHAVE – *Orthophytum grossiorum*, reguladores de crescimento, micropropagação, bromélias.

AGRADECIMENTOS

Apoiado financeiramente pela Fapemig

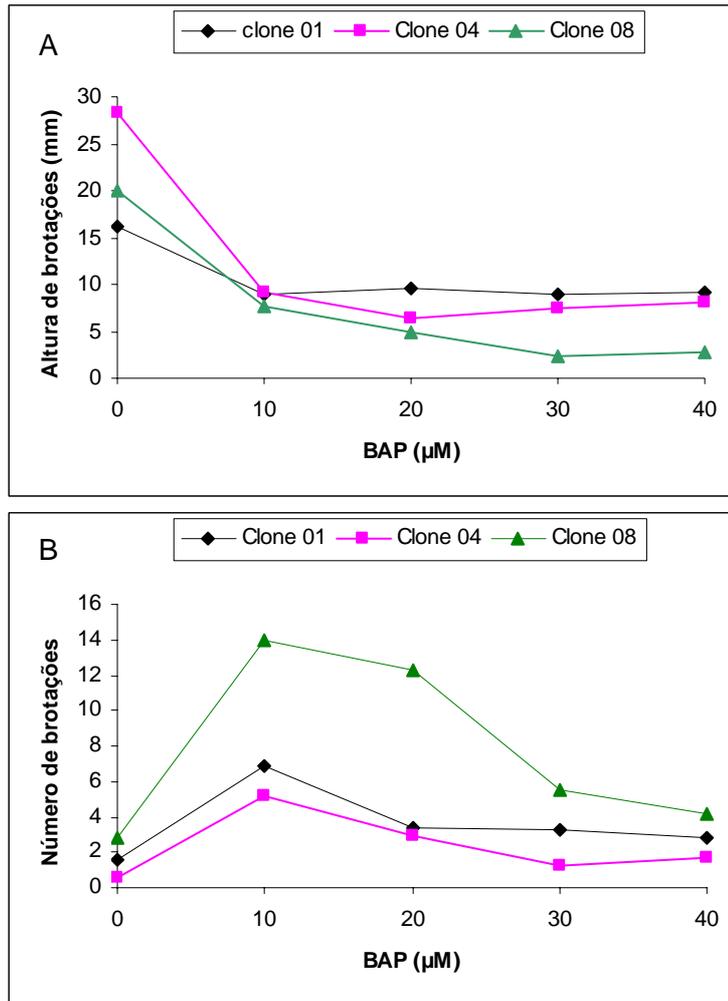


Figura 2: Efeito das concentrações de BAP no número médio de brotações (A) e no comprimento médio das brotações (B) *in vitro* nos Clones 01, 04 e 08 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.