Ajuste de protocolo para propagação *in vitro* para os clones 05 e 09 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.

Manfio, Candida Elisa[1]; Carvalho, Mychelle[2]; Moura, Elisa Ferreira[1]; Valente, Magno Sávio F_3; Motoike, Sérgio Y[4].

[1]Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFV-MG), email: cemanfio@yahoo.com.br; [2]Doutoranda 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* 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. Essa espécie apresenta grandes atributos ornamentais que podem ser potencialmente explorados, pois é de pequeno porte, fácil manejo, rústica, de fácil adaptação, 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.

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 conseqüência 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 para propagação *in vitro* para os clones 05 e 09 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.

METODOLOGIA

Os clones 05 e 09 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 ± 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 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 40 μmol m^{-2} 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 na etapa 1, quando foram selecionados clones com esta característica, contudo esta resposta é dependente do genótipo estudado. Para os Clones 05 e 09, a melhor concentração foi a de 20µM de BAP (Figura 1). Os efeitos dos reguladores de crescimento geralmente não são absolutos e específicos. A resposta das células, tecidos e órgãos *in vitro* varia principalmente com o genótipo da planta (George, 1996).

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).

O comprimento de brotações foi reduzido em todos os clones, na presença de BAP no meio de cultura, sendo os menores comprimentos observados, em geral, nas concentrações mais elevadas de BAP. A redução no comprimento médio de brotação observada com o aumento da concentração de BAP ao meio de cultivo pode ser atribuída à diminuição da relação auxina/citocinina das propágulos*in vitro*, o que pode levar a inibição do alongamento da brotação (Taiz e Zeiger, 2004). Outra provável causa para esta redução pode ser devido à competição das brotações emergentes, uma vez que o número de brotações aumenta em meio de cultivo contendo BAP. Em bromélias *A. imperialis* (Naves, 2001), *V. hieroglyphica* e *Vriesea forsteriana* (Mercier e Kerbauy, 1995), observou-se resultados semelhantes, mesmo sendo de subfamílias diferentes.

Observou-se também diferença do comprimento entre os clones na concentração zero de BAP, sendo o menor comprimento de brotação observado no Clone 09 (14 mm) e o maior comprimento observado no Clone 05 (29 mm). Mais uma vez demonstrando que há diferença em resposta *in vitro* entre os clones da mesma espécie estudados(Figura 1).

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).

Brotações má formadas foram observadas somente no Clone 05, em concentrações elevadas de BAP; contudo, em concentrações onde a multiplicação (número de brotações) é ótima não foi observada a ocorrência do mesmo. Essas brotações eram caracteristicamente hiperidricas.

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. Qi-Guang et al. (1986) observaram que o excesso de BAP inibiu a brotação de gemas, reduziu drasticamente número de partes aéreas por explante e promoveu a formação de calos em culturas de *Castanea mollissima*. 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;
- 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.

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.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004) Fisiologia Vegetal. 3ª Edição. Editora ARTMED. 719p.

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

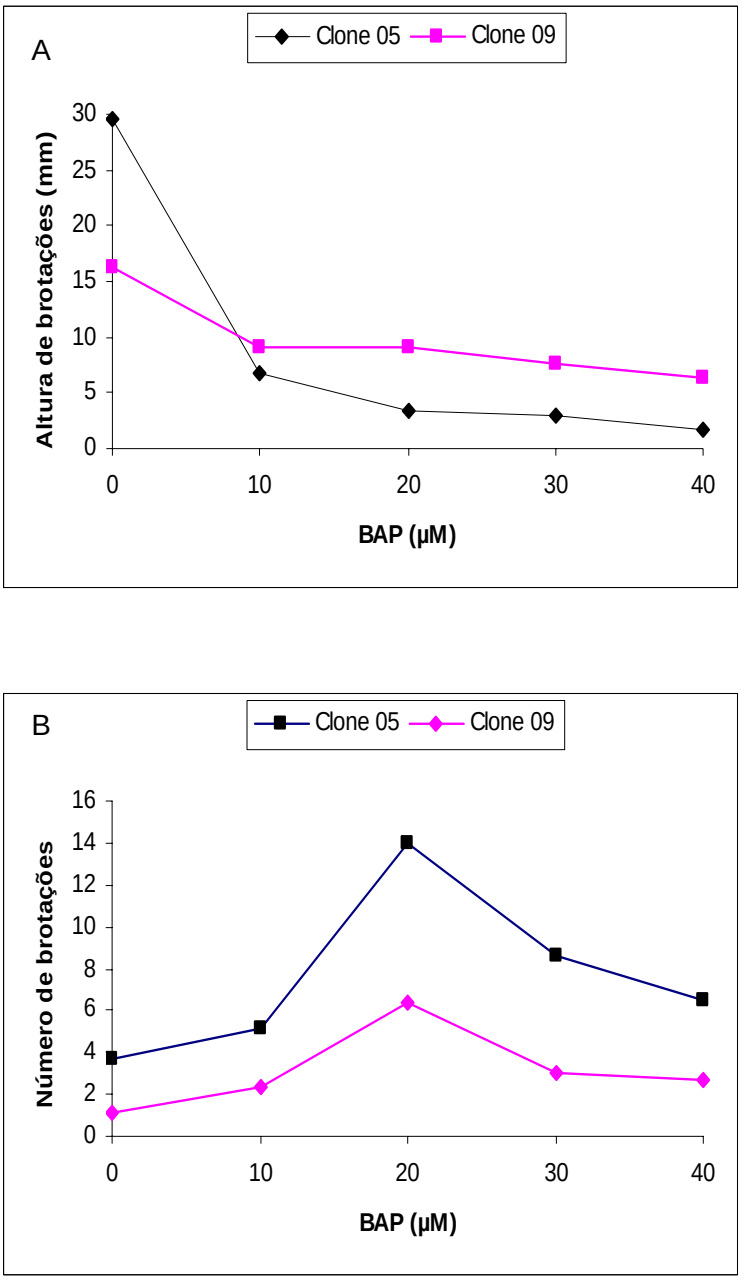


Figura 1: Efeito das concentrações de BAP no número médio de brotações (A) e no comprimento médio das brotações (B) *in vitro* nos Clones 05 e 09 de *Orthophytum grossiorum* Leme & Paula.