

## **Organogênese direta de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição a partir de plântulas em diferentes idades, submetidas a diferentes concentrações de ANA na presença de BAP.**

Lima, Carolina Oliveira de Cerqueira<sup>1,2\*</sup>; Santana, José Raniere Ferreira de<sup>2</sup>; Carneiro, Cláudia Elena<sup>3</sup>; Bellintani, Moema Cortizo<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (UEFS) cerqueira.carolina@gmail.com; <sup>2</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana- Avenida Presidente Dutra, s/n, Santa Mônica, Feira de Santana – BA, fone: (75) 3625-2300; <sup>3</sup> Laboratório de Micromorfologia Vegetal Av. Universitária, s/n - Km 03 da BR 116 Campus Universitário <sup>4</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, campos Universitário de Ondina, Salvador – BA, fone: (71) 3263-6544. mcbellintani@yahoo.com.br

### **INTRODUÇÃO**

A primeira bromélia identificada até o momento é um fóssil da data de mais de 36 milhões de anos encontrado na Costa Rica, denominado *Karatophillum bromelioides*. O primeiro registro em nossa civilização data de 1493, na segunda viagem de Cristóvão Colombo à América. De acordo com documentos, os nativos da ilha de Guadalupe, nas Antilhas, utilizavam uma planta muito saborosa como alimento, denominada por eles “karatas” – hoje o tão comum abacaxi (*Ananás comosus*). Desde então o abacaxi foi levado para a Europa e disseminado por todo o mundo. No final do século XVII, um padre francês, Charles Plumier, batizou as até então chamadas “karatas”, com o nome de bromélia, em homenagem ao botânico Olaf Bromel (PAULA e SILVA, 2004).

Durante incontáveis anos, diversas espécies de bromélias têm sido amplamente utilizadas como alimento ou na extração de fibras por populações nativas das três Américas. Há décadas, as bromélias são apreciadas como plantas ornamentais, especialmente nos EUA, na Europa e na Austrália, onde seu cultivo movimenta uma economia considerável, absorvendo, direta ou indiretamente, grande número de mão-de-obra (LEME, 1998; PAULA e SILVA, 2004).

A espécie *Orthophytum mucugense*, possui roseta foliar típica do gênero (*ortho*= reto; *phytum*= folha), ou seja, com presença de folhas geralmente patentes, formando um ângulo reto com o eixo da planta. As folhas são verdes e, na época de floração, tornam-se parcial ou completamente vermelhas, conferindo notável valor ornamental a esta espécie, como para a maioria dos representantes do gênero *Orthophytum* com inflorescência séssil (Wanderley e Conceição, 2006).

Métodos de cultura *in vitro* têm sido aplicados na conservação e multiplicação de genótipos específicos de bromélias. Esta técnica é muito importante para a indústria agrícola por proporcionar a rápida propagação, e disponibilizar uma grande quantidade de mudas com características homogêneas, independente da estação do ano (Carneiro & Mansur, 2004; Droste et al., 2005).

O sucesso da micropropagação em qualquer espécie depende da identificação dos tecidos mais adequados. De forma geral, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são os mais competentes e possuem maior potencialidade morfogenética (Pinto et al., 1994).

De acordo com Guerra et al. (1999), as condições que interferem no processo de organogênese podem ser classificadas em determinantes e permissivas. Nas primeiras salientam-se as “condições fisiológicas dos explantes” e o tipo e concentração de regulador de crescimento a ser utilizado como sinal químico para a indução/ativação da morfogênese. As chamadas condições permissivas incluem a composição geral dos meios de cultura e as condições físicas, tais como temperatura e fotoperíodo.

O objetivo desse trabalho foi o de avaliar o potencial organogênico de plântulas de *O. mucugense* em diferentes idades de desenvolvimento e diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA.

---

\* Apoio FAPESB.

## METODOLOGIA

Sementes de *Orthophytum mucugense*, foram coletadas no Parque Municipal Sempre – Viva, localizado no Município de Mucugê-BA. Os experimentos foram desenvolvidos na Unidade Experimental Horto Florestal no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

As sementes foram retiradas de frutos maduros e colocadas para secar sobre papel filtro durante três dias a temperatura ambiente. As sementes secas foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e hipoclorito 3% por 15 minutos com posteriores lavagens em água destilada autoclavada por duas vezes. A germinação ocorreu em meio com água destilada gelificada com ágar (7g.L).

Após a emissão dos primórdios foliares as plântulas foram transferidas para o MS com metade das concentrações salinas suplementado com 87,64mM de sacarose até atingirem a idade de desenvolvimento desejada.

Para avaliar a capacidade de multiplicação da espécie foram utilizadas plântulas com três idades de desenvolvimento (7,14 e 21 dias).

O meio utilizado para a multiplicação foi o MS/2 suplementado com 87,64 mM de sacarose, BAP a 2,22  $\mu\text{M}$ , diferentes concentrações de ANA (0,65; 1,3  $\mu\text{M}$ ) e 7g.L<sup>-1</sup> de ágar (Bellintani 2006). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que foi realizada sob a temperatura de 120°C por 15 minutos.

Durante todo o experimento os frascos foram fechados com película de polivinilcloro (PVC) e mantidos em laboratório sob a temperatura de 25  $\pm$  2°C, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 40 mol.  $\mu\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Com o termino do experimento foi retirada uma amostra por tratamento para ser avaliada através de estudos anatômicos por microscopia óptica com registros fotográficos. Trabalho realizado no Laboratório de Micromorfologia Vegetal (LAMIV) na UEFS.

Para análise histológica as amostras foram fixadas em álcool 70% e com auxilio de lâminas de barbear foram realizados corte a mão livre. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 3% por 15', corados com safrablau e analisados em microscópio óptico e fotografados.

Decorridos 60 dias da inoculação foram avaliados: o número de brotos por explante, percentual de explantes responsivos, tamanho dos brotos formados e registro anatômico.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (concentração do regulador de crescimento x idade dos explantes) utilizando 12 repetições com cinco amostra cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey (0,05), utilizando o programa estatístico SISVAR v. 4.3, desenvolvido pela UFLA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plântulas com 14 dias de idade apresentaram o melhor resultado nas três variáveis analisadas, exceto para o número de brotos na presença de 0,65  $\mu\text{M}$  de ANA, situação na qual não foram observadas diferenças significativas entre as plântulas com 7 e 14 dias (Tabela1 e Figura 1.F). Entre as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas, a combinação de 1,3  $\mu\text{M}$  de ANA com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou melhores resultados para o número de brotos formados e para o percentual de explantes responsivos, em plântulas com 14 dias de idade (Tabela1 e Figura 1F).

A espécie em estudo apresentou um baixo número de explantes responsivos o que pode justificar a baixa média encontrada no número de brotos formados. Provável influência da dominância apical, visto a espécie possui uma elevada taxa de auxina interna, comprovada pela facilidade de enraizamento que os brotos formados *in vitro* possuem (Bellintani, 2006).

O inicio da formação de brotos ocorreu entre a terceira e quarta semana após inoculação. Resultado semelhante ao encontrado por Bellintani (2006) ao estudar a resposta regenerativa de explantes caulinares na espécie *O. mucugense*. Considerando o número de brotos formados, Bellintani (2006) obteve uma maior média, provavelmente devido ao maior

tempo que os explantes permaneceram na presença de reguladores de crescimento (180 dias), enquanto o presente trabalho foi realizado em 60 dias. Mostrando a possibilidade de um maior rendimento caso o tempo do experimento fosse prolongado.

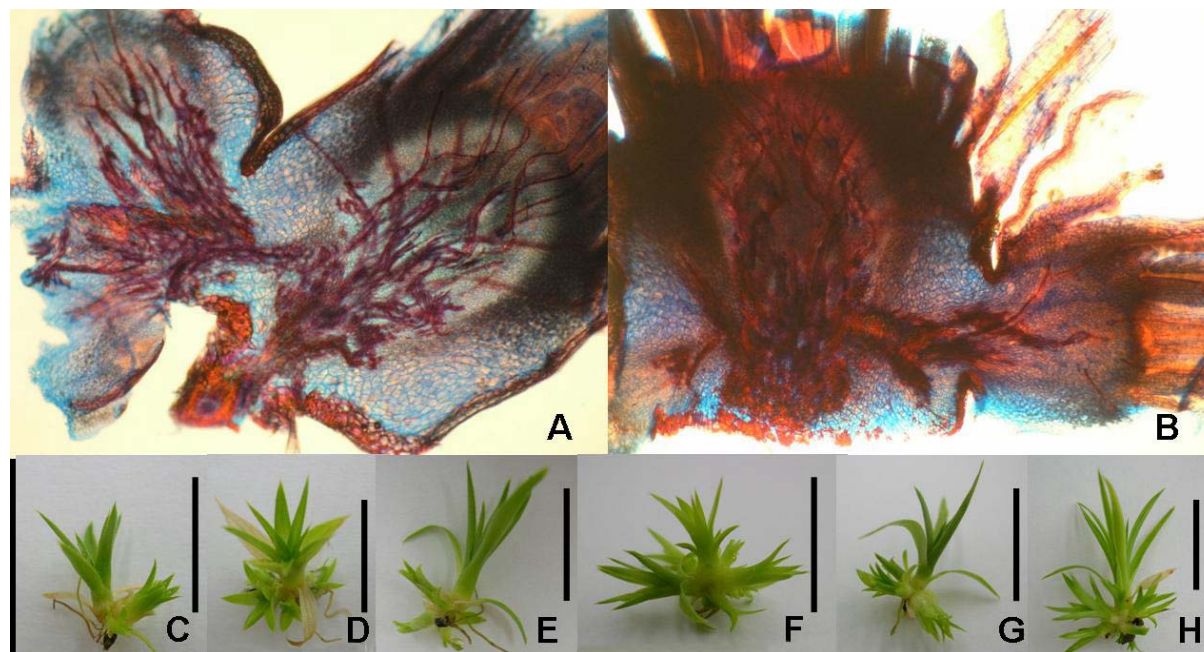
Tabela 1 - Média do número de brotos e comprimento dos brotos micropropagados por organogênese direta e porcentagem de explantes responsivos em função da idade do explante e da concentração de ANA na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP na espécie *Orthophytum mucugense*. Feira de Santana, 2006.

Concentração de ANA	Número de brotos		Tamanho dos brotos (mm)		% exp responsivos	
	0,65	1,3	0,65	1,3	0,65	1,3
7 dias	0,27Aab	0,27Ab	1,57Ab	1,92Ab	16,67Ab	18,33Ab
14 dias	0,67Ba	1,3Aa	4,11Aa	4,24Aa	38,33Ba	56,67Aa
21 dias	0,10Ab	0,40Ab	0,98Ab	1,71Ab	3,33Ab	20,00Ab

<sup>w</sup> - Média seguida pela mesma letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>z</sup> - Média seguida pela mesma letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A partir da análise anatômica (figura 1A-B) das plântulas micropropagadas foi possível confirmar a ocorrência de organogênese direta através da ligação existente entre os vasos condutores da planta mãe e dos brotos formados. Uma das diferenças encontradas entre organogênese e embriogênese é que a última possui sistema vascular fechado sem conexão com os vasos condutores do explante de origem (Peres, 2002).



**Figura 1.** Plântulas de *Orthophytum mucugense* micropropagadas em diferentes concentrações de ANA na presença de BAP a 2,22  $\mu\text{M}$ . A - anatomia de plântulas com 14 dias e suas brotações (ANA 0,65 $\mu\text{M}$ ); B - anatomia de plântulas com 21 dias e suas brotações (ANA 1,3  $\mu\text{M}$ ); C - plântula com 7 dias e suas brotações (ANA 0,65 $\mu\text{M}$ ); D - plântula com 7 dias e suas brotações (ANA 1,3  $\mu\text{M}$ ); E - plântulas com 14 dias e suas brotações (ANA 0,65 $\mu\text{M}$ ); F - plântulas com 14 dias e suas brotações (ANA 1,3  $\mu\text{M}$ ); G - plântulas com 21 dias e suas brotações (ANA 0,65 $\mu\text{M}$ ); H - plântulas com 21 dias e suas brotações (ANA 1,3  $\mu\text{M}$ ). As barras representam 1cm

Alguns estudos de micropropagação realizados com Bromeliaceae mostram grande potencial de responsividade. Barboza e Caldas (2001) utilizaram plântulas estioladas, com 5 a 7 cm sem folhas e, mostraram a importância do estiolamento na multiplicação de abacaxi onde obtiveram, na presença de 2mg/L de BAP, uma alta taxa de propagação (10,4 brotos por plântula).

#### CONCLUSÕES

Plântulas de *Orthophytum mucugense* com 14 dias na presença de BAP 2,22 µM e ANA 1,3 µM, apresentaram o melhor resultado considerando as variáveis analisadas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOZA, Sarah Brandão Santa Cruz; CALDAS, Linda Styer. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 3, 2001.

BELLINTANI, Moema Cortizo. **Estudos da propagação *in vitro* e *ex vitro* de *Neoregelia mucugensis* Leme, *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição e *Orthophytum albopictum* Philcox, espécies de Bromeliaceae endêmicas da Bahia**. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.

CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia** 2(1) p. 12- 20, 2004.

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

LEME, E.M.C., Canistropsis - **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 143p, 1998.

PAULA, Cláudio Coelho de & SILVA, Helena M. Peregrino da. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa: UFV, 3ed., 2004.

PERES, Lazaro E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. nº 23, mar-abr, 2002.

PINTO, J.E.B.P., ARELLO, E.F., PINTO, C. A. B. P., BARBOSA, M.H.P. Uso de Explantes e Concentrações de Benzilaminopurina na Multiplicação *in Vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v 29, n.6, p.867-873. Jun. 1994.

WANDERLEY, Maria das Graças Lapa & CONCEIÇÃO, Abel Augusto. Notas Taxonômicas e uma nova espécie do gênero *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 1, p.3-8, 2006.

#### PALAVRAS-CHAVE:

*Orthophytum mucugense*; Bromeliaceae; Organogênese direta.