

Influência da idade e do tipo de explante na organogênese direta de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição, submetido a diferentes concentrações de ANA na presença de BAP.

Lima, Carolina Oliveira de Cerqueira^{1,2*}; Santana, José Raniere Ferreira de²; Carneiro, Cláudia Elena³; Lima-Brito, Alone^{2,4}; Bellintani, Moema Cortizo⁵.

¹Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (UEFS) cerqueira.carolina@gmail.com; ²Laboratório 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; ³ Laboratório de Micromorfologia Vegetal Av. Universitária, s/n - Km 03 da BR 116 Campus Universitário ⁴ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Botânica (UEFS).⁵Laboratório 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

Bromeliaceae representada por cerca de 3.000 espécies, é uma família essencialmente americana, distribuindo-se do sul dos Estados Unidos até o Chile, com única exceção da *Pitcairnia feliciana* encontrada no Golfo da Guiné. No Brasil encontra-se amplamente distribuída e devido a estabilidade geológica do território brasileiro encontramos vários gêneros endêmicos, como por exemplo *Orthophytum* (LEME, 1998). A roseta foliar em *Orthophytum mucugense* é típica para o gênero com presença de folhas geralmente patentes. As folhas na época de floração tornam-se parcial ou completamente vermelhas, conferindo notável valor ornamental (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 a obtenção de mudas com características homogêneas, independente da estação do ano (CARNEIRO e MANSUR, 2004; DROSTE et al., 2005).

O sucesso da micropropagação em qualquer espécie depende da identificação dos tecidos mais adequados para o processo. De forma geral, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica possuem maior potencialidade morfogênica (PINTO et al., 1994).

A obtenção de organogênese *in vitro* é atualmente um processo empírico onde são testados para todas as espécies, condições como: fonte de explante, composição mineral do meio de cultura (e também suas vitaminas e fontes de carbono) balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial organogênico do rizoma, folha e raiz da espécie *O. mucugense* em diferentes idades de desenvolvimento submetidos a diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA na presença de BAP.

METODOLOGIA

Coletas das sementes de *Orthophytum mucugense* ocorreram no Parque Municipal Sempre – Viva, localizado no Município de Mucugê-BA; o experimento de organogênese foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e os cortes anatômicos no Laboratório de Micromorfologia Vegetal (LAMIV); ambos laboratórios da UEFS.

Para assepsia das sementes foi utilizado álcool 70% durante 1' e hipoclorito 3% por 15' com posteriores lavagens em água destilada autoclavada por três 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 da concentração salina (MS/2) suplementado com 87,64mM de sacarose até atingirem a idade de desenvolvimento desejada. Faltando duas semanas da idade esperada os frascos contendo as plântulas foram mantidos no escuro.

* Apoio FAPESB

Para avaliar a capacidade de multiplicação da espécie foram utilizadas três fontes de explante (raiz, rizoma e folha) em três idades de desenvolvimento (20, 40 e 60 dias).

O meio utilizado para a multiplicação foi o MS/2 suplementado com sacarose (87,64 mM), ágar (7g.L^{-1}), BAP ($2,22\ \mu\text{M}$) e diferentes combinações de ANA (0,65; $1,3\ \mu\text{M}$) (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 polivinilcloreto (PVC) e mantidos em laboratório sob a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $40\ \text{mol.}\ \mu\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

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

Para análise histológica uma amostra de cada tratamento foi fixada em álcool 70% e com auxílio 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.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 3 \times 3$ (concentração de ANA x idade dos explante x tipos de explantes) utilizando 12 repetições com cinco amostras 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 UFPA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a organogênese direta em *Orthophytum mucugense* é influenciada pelo tipo e idade do explante e pode ser manipulada pela alteração no balanço auxina/citocinina.

O explante rizoma apresentou o melhor resultado em todas variáveis analisadas, diferindo significativamente de folha e raiz, independente da concentração de ANA utilizada (Tabela 1, Figura 1B).

Tabela 1. Indução de morfogênese em *Orthophytum mucugense* a partir dos explantes rizoma, folha e raiz em meio suplementado com diferentes concentrações de ANA.

ANA (μM)	Tipo de explante		
	Rizoma	Folha	Raiz
	% de explantes responsivos		
0,65	46,11A ^w a ^z	9,44Ab	0,00Ab
1,3	43,33Aa	14,44Ab	0,00Ac
	Nº de brotos/explantes		
0,65	1,21Aa	0,26Ab	0,00Ab
1,3	0,87Ba	0,33Ab	0,00Ab
	Comprimento dos brotos		
0,65	5,53Aa	1,63Ab	0,00Ac
1,3	4,18Ba	2,71Aa	0,00Ab

^w Média seguida pela mesma letra maiúsculas na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^z - Média seguida pela mesma letra minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ocorreu formação de brotos com a utilização do explante folha nas duas concentrações de ANA (Figura 1A), com uma média de menos de um broto por explante (Tabela 1). A formação direta de gemas adventícias na base foliar é devida à presença de meristemas intercalares nesse local (MERCIER e NIEVOLA, 2003). Hamasaki et al. (2005) obteve um aumento de 46% para 70% na taxa de regeneração de brotos micropropagados a partir de bases foliares de abacaxi, ao utilizarem 8mM de glutamina, o que indica que o uso de glutamina favorece a aquisição de competência à organogênese dos explante foliares, podendo ser um ótimo instrumento para trabalhos futuros com *Orthophytum mucugense*.



Figura1. Brotos micropropagados de *Orthophytum mucugense* a partir dos explantes folha (A) e rizoma (B). (Barra = 1cm)

A partir da análise anatômica mostrada nas figuras 2A e 2B foi possível confirmar a ocorrência de organogênese direta pela junção existente entre o tecido de origem e o broto em formação. Não ocorreu desdiferenciação do explante, com a passagem pela fase de calo antes da formação do broto, o que classificaria o processo como organogênese indireta (PERES, 2002).

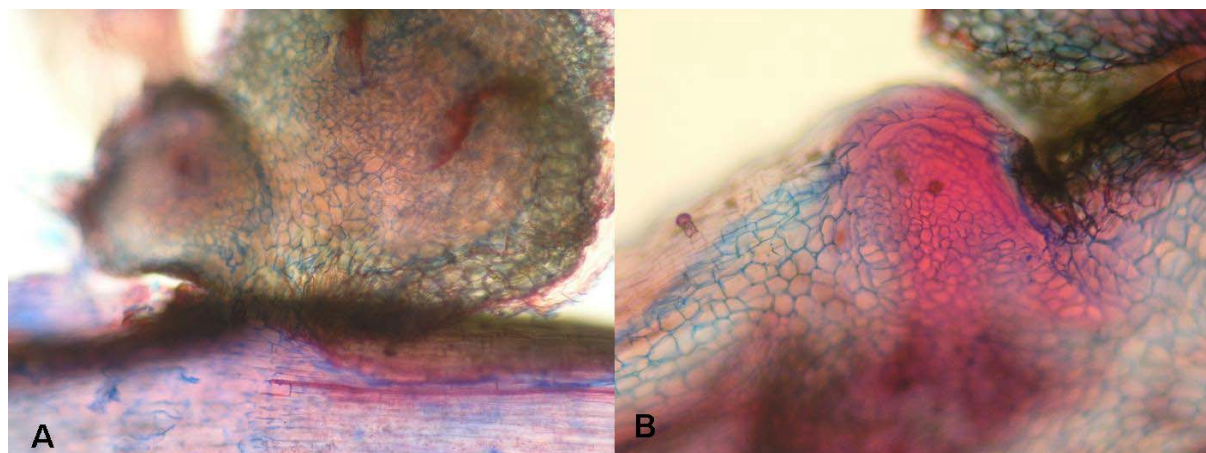


Figura 2. Anatomia da organogênese direta de *O. mucugense* nos explantes folha (A) e rizoma (B).

A raiz não apresentou competência organogenética como pode ser observado na tabela 1. Apesar de possuir tecidos meristemáticos nos ápices e no periciclo algumas raízes apresentam extrema determinação, sendo difícil a formação de gemas caulinares (PERES, 2002).

A utilização do explante rizoma retirados de plântulas com 40 dias de idade proporcionou os melhores resultados para % de explantes responsivos e nº de brotos por explantes, independente da concentração de regulador utilizada (Tabela 2), o que demonstra a importância da idade do explante na indução de organogênese em *O. mucugense*.

Tabela 2. Indução de morfogênese em *O. mucugense* a partir do explante rizoma em diferentes idades de desenvolvimento em meio suplementado com diferentes concentrações de ANA.

ANA (μ M)	Idade do explante (dias)		
	20	40	60
	% de explantes responsivos		
0,65	55,00A ^w b ^z	55,00Aa	33,33Aa
1,3	48,33Aa	56,67Aa	25,00Aa
	Nº de brotos/explante		
0,65	1,02Aa	1,25Aa	1,37Ba
1,3	0,45Aab	1,20Ab	0,38Aa
	Comprimento dos brotos		
0,65	4,62Ab	7,80Aa	4,15Ab
1,3	4,15Aab	5,99Aa	3,69Ab

^w Média seguida pela mesma letra maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^z - Média seguida pela mesma letra minúsculas na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CONCLUSÃO

O rizoma retirado de plântulas com 40 dias demonstrou ser a melhor fonte de explante para a organogênese direta de *Orthophytum mucugense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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** v.2, n.1, p. 12- 20, 2004.

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 Archives of biology and Technology** v.48, n.5, p. 717-722, 2005.

HAMASAKI, Regina M; PURGATTO, Eduardo & MERCIER, Helenice. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.17,n.4, p.383-389, 2005.

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

MERCIER, Helenice & NIEVOLA, Catarina C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégias de preservação. **Vidalia**, v.1, n.1,p.57-62, 2003.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociências & Desenvolvimento** n.25, p. 44-48. 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.