

## MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *CYRTOPODIUM ALICIAE* (ORCHIDACEAE)

**Emile Lemos Freitas<sup>1</sup>; Alone Lima-Brito<sup>2</sup>; José Raniere Ferreira de Santana**

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [emile.lemos@yahoo.com.br](mailto:emile.lemos@yahoo.com.br)
2. Bióloga do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimental Horto Florestal. Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: [lima\\_brito@yahoo.com.br](mailto:lima_brito@yahoo.com.br).
3. Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Ciências Biológicas, e-mail: [raniere@uefs.br](mailto:raniere@uefs.br).

**PALAVRAS CHAVES:** orquídea, micropropagação, organogênese direta

### INTRODUÇÃO

O cultivo comercial de orquídeas tem crescido muito nos últimos anos e representa uma das ornamentais mais cobiçadas pelos consumidores, no Brasil e no mundo, devido à exuberância de suas flores, delicadeza, diversidade de tamanhos, cores e formas. Para suprir as necessidades de produção, as técnicas de cultura *in vitro* são indicadas para acelerar e aperfeiçoar o processo produtivo (FARIAS *et al.*, 2012).

A cultura de tecidos vegetais é apontada como uma alternativa tanto para a multiplicação como para a conservação de espécies nativas. As principais vantagens da técnica são as altas taxas de multiplicação comparadas com técnicas tradicionais, eliminação de doenças, qualidade fitossanitária e o estabelecimento de bancos *ex situ* de germoplasma (SOUZA *et al.*, 2000).

A escolha do explante corresponde à primeira fase da multiplicação, o estabelecimento. O tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a sua capacidade para se adequar às condições *in vitro*, sendo recomendados os que contenham maior proporção de tecido meristemático por apresentarem uma maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Outro fator importante é a escolha do regulador e sua concentração. O 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada em cultura de tecidos, pois além do custo mais baixo, estimula a brotação (HU & WANG, 1983).

*Cyrtopodium aliciae* é uma orquídea com poucos registros na literatura sendo estes concentrados em sua morfologia. É uma erva rupícola com inflorescência racemosa sendo reconhecida pela coloração branca com máculas purpúreas e forma de seus segmentos florais de margens onduladas (AZEVEDO & VAN DEN BERG, 2007). *C. aliciae* é uma espécie endêmica do Brasil, ocorrendo na Chapada Diamantina com significativo potencial econômico e exploração exclusivamente extrativista, o que tem reduzido suas populações naturais.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* de *C. aliciae*, utilizando-se diferentes tipos de explante e concentrações de BAP para a obtenção de brotos pela via organogênica direta.

### MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais na Unidade Experimental-Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Foram utilizados como explante base foliar, segmento nodal e ápice de raiz com aproximadamente 1 cm, extraídos de plântulas germinadas previamente *in vitro*.

Esses explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS com metade da concentração salina (MS/2) gelificado com 7g/l de ágar, suplementado com 15g/l de sacarose, 1g/l de carvão ativo e cinco concentrações da citocinina BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 $\mu$ M). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 3x5 (explante x BAP) com 5 repetições e quatro tubos por repetição (um explante por tubo) totalizando 15 tratamentos.

O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e autoclavados a 120°C a 1 atm, por 15 minutos. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h e radiação fotossintética ativa de  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Aos 90 dias de inoculação, foram avaliadas as variáveis: número de brotos por explante, comprimento dos brotos, número de protocormos, número de raízes por explante, comprimento das raízes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A multiplicação *in vitro* de *C. aliciae* foi influenciada pelo tipo de explante independente da concentração de BAP adicionado ao meio de cultura (tabela 1). Os resultados obtidos apontam o explante segmento caulinar como o mais responsivo para todas as variáveis analisadas. A base foliar não respondeu aos tratamentos ou teve respostas pouco significativas.

Para número e comprimento médio dos brotos, as maiores médias foram obtidas a partir do explante segmento caulinar. Estes resultados podem estar relacionados a uma menor diferenciação dos tecidos neste explante quando comparados com base foliar e ápice da raiz.

Estudos com outras espécies herbáceas têm relatado a diversidade de resposta morfogênica em função de tipo de tecido utilizado (Lima-Brito *et al.* 2010, Lima *et al.*, 2012), o que demonstra a importância da escolha do explante para o estabelecimento das culturas *in vitro*.

Não houve diferença para as variáveis número e comprimento médio dos brotos entre os meios com e sem BAP. Estes resultados diferem dos encontrados por Araujo *et al.* (2004) com gloxínia que obteve uma aumento no número de brotos por explante (3,5) com a utilização de 9,99  $\mu$ M de BAP. No mesmo estudo, foi observado que a altura dos brotos obteve uma resposta linear decrescente em função do aumento das concentrações de BAP.

As maiores médias para número e comprimento médio da raiz foram obtidas com o explante segmento caulinar, não havendo diferença significativa entre as concentrações de BAP para a variável número de raízes. Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, Bertoncelli (2010) obteve menor formação de raízes utilizando 2,22  $\mu$ M de BAP no cultivo de *Physalis pubences*.

O comprimento médio das raízes aumentou com o aumento da concentração de BAP; resultados que discordam dos encontrados por Silva (2006) e Martini (2010) trabalhando com *Cucurbita pepo*, e com *Gongora quinquenervis*, uma orquídea, respectivamente.

O número de protocormos apresentou diferença significativa entre os explantes: as menores médias foram obtidas com a base foliar; enquanto o seguimento caulinar e a raiz obtiveram resultados semelhantes. Para o explante segmento caulinar as menores médias para a formação de protocormos foram obtidas em meio livre de regulador. Pedroza-Manrique (2009) observou um efeito positivo, de BAP na formação de protocormos em *Epidendrum elongatum*.

A formação de protocormos é muito importante para a organogênese direta. Segundo

Pridgeon et al. (1999), o protocormo é uma estrutura efêmera resultante da germinação de sementes de orquídeas, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular. A presença de protocormos indica um potencial de formação de uma nova planta.

O aumento no número de dias para a avaliação do experimento pode auxiliar numa melhor avaliação da organogênese do material avaliado. No entanto, a presença de um maior número de brotos no explante seguimento caulinar indica que a formação dessas estruturas iniciou-se mais precocemente. Isso é um fator que diminui os custos de produção e aumenta o número de plantas em relação ao obtido pelo explante raiz.

Tabela 1. Média das variáveis avaliadas na multiplicação de *Cyrtopodium aliciae* obtidos a partir de diferentes tipos de explantes, cultivados em meios de cultura MS/2 e suplementados com BAP.

	BAP ( $\mu\text{M}$ )				
	0	2,22;	4,44	6,66	8,88
	Número de brotos				
<b>Base foliar</b>	0 B a	0,05 B a	0 B a	0 C a	0 Ca
<b>Raiz</b>	0,35 B a	0,42 B a	0,4 B a	0,72 B a	0,45 Ba
<b>SegmentoCaulinar</b>	1,15 A a	1,83 A a	1,03 A a	1,83 A a	1,15 A a
	Número de protocormos				
<b>Base foliar</b>	0,05 B a	0,1 B a	0 B a	0 B a	0 A a
<b>Raiz</b>	1,5 A a	1,92 A a	0,7 AB a	1,43 A a	0,9 AB a
<b>SegmentoCaulinar</b>	0,5 AB b	1,7 A a	1,35 A ab	1,7 A a	1,55 A ab
	Comprimento médio de brotos				
<b>Base foliar</b>	0 B a	0,38 B a	0 B a	0 B a	0 B a
<b>Raiz</b>	0,8 B a	0,68 B a	0,24 B a	0,71 B a	1,06 B a
<b>SegmentoCaulinar</b>	3,91 A a	4,95 A a	4,21 A a	4,95 A a	4,87 A a
	Número de raízes				
<b>Base foliar</b>	0 B a	0,1 B a	0 B a	0 B a	0 B a
<b>Raiz</b>	0,48 B a	0,57 B a	0,35 B a	0,72 B a	0,65 B a
<b>SegmentoCaulinar</b>	2,12 Aa	2,1 Aa	1,78 Aa	2,1 Aa	2 Aa
	Comprimento médio de raiz				
<b>Base foliar</b>	0 Ba	0,28 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba
<b>Raiz</b>	0,65 Ba	0,75 Ba	0,83 Ba	0,69 Ba	0,55 Ba
<b>SegmentoCaulinar</b>	2 Ab	2,86 Aab	2,71 Aab	2,86 Aab	3,33 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade de erro.

## CONCLUSÕES

A técnica de cultura de tecidos vegetais mostrou-se uma alternativa viável para a produção de brotos de *C. aliciae*.

A obtenção de brotos *in vitro* via organogênese direta de *C. aliciae* é possível a partir do segmento caulinar em meio de cultura MS/2 livre de regulador de crescimento.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. G., C. V. A. FIORINI, M. PASQUAL, A. B. DA SILVA E F. VILLA. 2004. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). **Revista Ceres**, 51 (293): 117-127.
- AZEVEDO, C.O. & VAN DEN BERG, C. 2007. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea** 34(1): 1-47.
- BERTONCELLI, D. J.; OLIVEIRA, M. C. **Avaliação de diferentes explantes e combinações de reguladores vegetais (bap e ana) no cultivo *in vitro* de *physalis pubescens* L.** Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária – Ciências Agrárias, Animais e Florestais, 2010
- FARIAS, R. T.; ASSIS, A. M., UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J.F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório.** Editora Macenas, Londrina, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: **Macmillan**, 1983.
- LIMA, C.O.C.L., MARCHI, M.N.G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C.E. MELINTANI, M.C. SANTANA, J.R. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v.42, n.2, p.249-254. 2012.
- LIMA-BRITO, A. L.; RESENDE, S. V.; LIMA, C. O. C.; ALVIM, B. M.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. *In vitro* Morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.3, p.502-510, 2011.
- MARTINI, P.C., WILLADINO, L., ALVES, G.D. E DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semente *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2001
- PEDROZA-MANRIQUE, J. A. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina ( BAP ) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. **Revista Colomb. Biotecnol.**, 2009
- PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J. & CHASE, M.W. **Genera Orchidacearum: General introduction , Apostasioideae, Cypripedioideae.** Oxford University Press, Oxford, 1999.
- SOUZA, A. S., CORDEIRO, Z. J.M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Zilton José Maciel. (Org.). **Banana. Produção: Aspectos Técnicos** Brasília: EMBRAPA, 2000.