

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* POR VIA INDIRETA DE
CYRTOPODIUM ALICIAE (ORCHIDACEAE)
Emile Lemos Freitas¹; Alone Lima-Brito²; José Raniere Ferreira de Santana**

1. Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais- Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: 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: limabrito@yahoo.com.br.
3. Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Ciências Biológicas, e-mail: raniere@uefs.br.

PALAVRAS CHAVES: orquídea; organogênese indireta; protocormo

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as ornamentais mais procuradas em todo o mundo devido à exuberância e diversidade de tamanhos e cores de suas flores. O comércio tem crescido muito nos últimos anos e é abastecido, muitas vezes, por praticas extrativistas, retirada desordenada de orquídeas silvestres do seu ambiente natural, expondo algumas espécies à extinção (ALTAFIN *et al*, 2007). As técnicas de cultura *in vitro* são uma alternativa viável para a produção massal e são indicadas para acelerar e aperfeiçoar o processo produtivo reduzindo os impactos às populações naturais (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 conservação de germoplasma (SOUZA *et al.*, 2000).

A organogênese indireta é uma das ferramentas da cultura de tecidos, nela o tecido utilizado deve ser submetido à desdiferenciação celular, formando uma estrutura denominada calo, para posteriormente haver a formação do primórdio caulinar e ou radicular (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A via indireta de regeneração tem como vantagens a produção de um grande número de plantas a partir de um único explante além da possibilidade de gerar indivíduos geneticamente diferentes da planta mãe aumentando assim a variabilidade genética da espécie propagada.

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.

Assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* de *Cyrtopodium aliciae*, a partir do protocormo e diferentes concentrações de BAP para a obtenção de brotos pela via organogênica indireta.

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).

Foi utilizado como explante o protocormo oriundo de plantas germinadas *in vitro*. O explante foi inoculado 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 de citocinina BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições e quatro tubos por repetição (um explante por tubo) totalizando 5 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: percentual de explantes que originou brotos, número de brotos por explante, comprimento médio dos brotos, explantes com calo, número de raízes por explante, comprimento médio das raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado a formação de calo em todos os tratamentos. No entanto, o regulador vegetal utilizado não influenciou a multiplicação de *C. aliciae*, não sendo observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% entre o controle e os tratamentos utilizando BAP.

O percentual de explantes com broto teve uma média 83 a 95% de regeneração de brotos, estes tiveram uma média de 2,87 a 5,97 brotos por explantes com comprimento médio de 1,21 a 1,40 cm de altura. O percentual de explantes com calo no momento da avaliação foi de 37 a 60%, indicando que ainda havia intensa divisão celular, um potencial ainda maior para a produção de brotos. O número de protocormos em formação é outro indicador do potencial de formação de brotos tendo média de 5,45 a 14,0 protocormos por explante. Os brotos formados apresentavam, em sua maioria, raízes, indicando a formação de brotos completos, fato que facilita a etapa futura de aclimatização.

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

BAP (μM)				
0,00	2,22	4,44	6,66	8,88
% explantes com brotos (%)				
83	95	87	95	90
número de brotos por explante				
2,87	3,68	5,97	4,00	3,90
comprimento médio dos brotos (cm)				
1,32	1,38	1,21	1,28	1,40
explantes com calo (%)				
48	37	63	60	45
número de protocormos por explante				
7,53	7,87	14,0	5,45	6,77
número de raízes por explante				
3,20	3,18	5,00	2,65	2,98
comprimento médio das raízes (cm)				
1,34	1,46	0,66	1,23	1,83

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

Barabé *et al.* (1993) propõem um modelo no qual um único protocormo possuía muitos epiblastos ou centros regenerativos, cada um capaz de produzir uma planta. Martini *et al.* (2001) confirmam esse modelo a partir da análise histológica dos calos oriundos dos protocormos. Os pontos de diferenciação observados nos cortes histológicos referenciavam-se ao meristema apical e aos primórdios foliares.

São poucos os trabalhos de multiplicação em Orchidaceae, e a utilização do explante protocormo é pouco usual. Segundo Sherlock (2009), o protocormo de *Encyclia alboxanthina* não apresentou capacidade organogênica após 90 dias em nenhuma das condições de cultura testadas. Martini *et al.* (2001), trabalhando com *Gongora quinquenervis*, observaram que a presença de BAP ao meio de cultura diminuía a formação de calos e a rizogênese dos protocormos, sendo encontrado maiores brotações por via indireta a partir do meio na ausência do regulador de crescimento.

Um dos resultados da organogênese indireta é a possibilidade da obtenção de variação somaclonal, que aumenta a variação genética, sendo que esta é dependente da espécie vegetal. Essa, ainda que indesejada na propagação clonal, pode ser amplamente utilizada em programas de melhoramento, gerando novas cultivares de plantas (AMIRATO, 1986). As variações somaclonais têm origem em alterações na ploidia da célula e/ou variações epigenéticas, como mutações, rearranjos cromossômicos, transposons, metilação de DNA, entre outros (NEUMANN *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

A multiplicação pela via indireta de *C. aliciae* pode ser feita na ausência de reguladores de crescimento com a utilização do explante protocormo.

REFERÊNCIAS

- AMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.). Plant tissue culture and its agricultural applications. Cambridge: University press, 1986.
- ALTAFIN, R. L. M.; MENEZES, M. O.; LIMA, R. R. F.; PITOMBO, L. M. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. Boletim Técnico, Espírito Santo do Pinhal, n.7, p., 2003.
- AZEVEDO, C.O. & VAN DEN BERG, C. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. Hoehnea, v. 34, p. 1-47, 2007.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D. Sur la nature des protocormes d' orchidées (ORCHIDACEAE). Comptes Rendus De L'Académie Des Sciences, Paris, v. 316, p. 139-144, 1993.
- 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
- 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.
- NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. Plant cell and tissue culture – a toll in biotechnology: basics and application. Berlin: Springer Verlag, 2009.
- SHERLOCK, E. M. Propagação *in vitro* de *Encyclia alboxanthina* fowlie (orchidaceae): espécie endêmica da Chapada Diamantina-Bahia. Dissertação de Mestrado, 2009. Disponível em:
http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2007/emilia_machado_sherlock-dissertacao.pdf. Acessado em: 01/10/2012.

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.