

INDUÇÃO À ORGANOGÊNESE IN VITRO DE HADROLAELIA JONGHEANA

Emiliane Silva de Freitas¹; JamilleSteffanyColatino de Souza²; Tomás Gomes Reis Veloso¹; Ana Claudia Ferreira da Cruz³; Melissa FaustBocayuva Cunha³; Maria Catarina Megumi Kasuya⁴

Resumo: *Apesar de diversa, a família Orchidaceae vem sendo alvo de fatores que a expõe a risco extinção, o que justifica o estudo de mecanismos de propagação com o intuito de preservar estas espécies. O objetivo do trabalho foi a obtenção de protocormos a partir da indução à organogênese em explantes de Hadrolaeliajongheana em simbiose com fungo micorrízico. Explantes extraídos de plantas previamente micorrizadas foram inoculados sob diferentes concentrações de ANA e BAP, e após 90 dias foi feita a avaliação da organogênese. Os explantes radiculares não responderam à indução morfogênica e, adicionalmente, houve muita contaminação devido a pré- inoculação do simbiote. Dentre os explantes foliares, o tratamento B4A2 (4 mg L⁻¹ de BAP adicionado de 2 mg L⁻¹ de ANA) foi o que apresentou melhor resultado para indução à embriogênese. Entretanto, as brotações também foram prejudicadas pela contaminação fúngica. A utilização de culturas simbióticas para obtenção de protocormos, a partir de cultura de tecidos, pode tornar o processo limitado.*

Palavras-chave: *Brotos, extinção, micropropagação, orquídea, simbiose*

Abstract: *Although diverse, the Orchidaceae family has been the target of factors that exposes it to risk of extinction, which justifies the study of propagation mechanisms in order to preserve these species. The objective was to obtain*

²Mestranda em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Microbiologia Agrícola (DMB), e-mail:emilianefreitas@ufv.br, tomasgomesrv@gmail.com.

²Engenhaira agrônoma- UFV, Departamento de Biologia Vegetal, e-mail: jamillecollatino@gmail.com

³Pós-doutoranda – Universidade Federal de Viçosa UFV, DMB, e-mail: aclaudia5@hotmail.com, melissabocayuva@hotmail.com

⁴Professor Titular - UFV, DMB, e-mail: mkasuya@ufv1.br

protocorm after induction of organogenesis in explants of Hadrolaelia jongheana in symbiosis with mycorrhizal fungi. Explants taken from the previously mycorrhizal plantlets were transferred to media containing different concentrations of NAA and BA, and after 90 days, the organogenesis was evaluated. Root explants did not respond to morphogenesis induction and additionally there was high level of contamination due to pre inoculation of symbiont. Among the leaf explants, the B4A2 treatment (4 mg L⁻¹ BAP addition of 2 mg L⁻¹ NAA) showed the best result for induction of embryogenesis. However, the shoots were also damaged by fungal contamination. The use of symbiotic cultures to obtain protocorm from tissue culture, might make the process limited.

Keywords: Extinction, micropropagation, orchid, shoots, symbiosis

Introdução

Orchidaceae é uma das maiores famílias dentro das angiospermas e suas espécies estão amplamente distribuídas em diferentes habitats. As orquídeas apresentam sementes desprovidas de tecido de reserva, característica que as tornam altamente dependentes de fontes de carbono externas para que ocorra a germinação, o que na natureza é suprido através de associações com fungos micorrízicos (Dearnaley, 2007). Apesar da grande diversidade, destruição dos habitats, a pressão de coleta e o baixo sucesso reprodutivo, são fatores que têm contribuído para extinção de espécies desta família. Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas que visem a propagação destas espécies, sendo a cultura de tecidos uma estratégia promissora. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi a obtenção de protocormos a partir da indução à organogênese em explantes de *Hadrolaelia jongheana* micorrizada.

Material e Métodos

Explantes foliares e radiculares obtidos de plântulas germinadas in vitro, em associação simbiótica, de *H. jongheana*, foram excisados pela técnica de Thin Cell Layer (TCL) com auxílio de pinça e bisturi, em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram inoculados, sob condições assépticas, em placas

de Petri descartáveis 90 x 15 mm (J. Prolab, Curitiba, Brasil) contendo 25 mL de meio Knudson C acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, complexo vitamínico de Gamborg, 5 mM de cisteína, diferentes concentrações de BAP (6- Benziladenina) e ANA (Ácido naftalenoacético) e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar Sigma® (Sigma Aldrich) tendo o pH ajustado para 5,6 e posteriormente autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. Em cada placa de Petri foram inoculados quinze explantes, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição de um total de 5 repetições por tratamento. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C, por 90 dias.

Os tratamentos, a saber, foram: Controle (0 BAP e 0 ANA); B1A0,5 (1 g L⁻¹ BAP e 0,5 g L⁻¹ ANA), B2A1 (2 g L⁻¹ BAP e 1 g L⁻¹ ANA), B4A2 (4 g L⁻¹ BAP e 2 g L⁻¹ ANA), e, B6A3 (6 g L⁻¹ BAP e 3 g L⁻¹ ANA). As variáveis analisadas SR (Sem Responsividade); Oxidação e Embriogênese foram determinadas por frequência (%).

Para as variáveis sem responsividade (SR) e oxidação (OX) realizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos (B0A0; B1A0,5; B2A1; B4A2 e B6A3), com 5 repetições por tratamento, e cada repetição sendo composta por 15 explantes/placa. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Por não seguirem as pressuposições de normalidade, as variáveis SR e OX foram transformadas para arcsen .

Para a variável organogênese (ORG), realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, no qual foram dadas as seguintes notas: 0-19% (1); 20-39 (2); 40-59 (3); 60-79 (4); 80-100 (5).

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A tabela foi apresentada com médias não transformadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2011).

Resultados e Discussão

Os explantes radiculares não foram responsivos à indução morfogênica em *H. jongheana* (Tab.1). Estes explantes frequentemente apresentaram

contaminações (Fig. 1A), devido a pré-existência de fungos rizoctonioides. Como discutido anteriormente, em cultura de tecidos considera-se contaminação pela competição dos microrganismos com as plantas pelos nutrientes do meio de cultura e por excretarem substâncias que são geralmente tóxicas aos cultivos no meio de cultura, levando-as à morte (Costa et al., 2010).

Para a variável organogênese, o tratamento B4A2 obteve o maior somatório de notas (10), seguido de B1A0,5 (7), B0A0, B2A1 e B6A3 (5), constatando-se assim, que o melhor balanço hormonal para indução à organogênese nestas plantas é 4 mg L⁻¹ de BAP adicionado de 2 mg L⁻¹ de ANA.

As variáveis Sem Responsividade (SR) e Oxidação não apresentaram diferença estatística, tanto para explantes radiculares quanto explantes foliares (Tab. 1). Entretanto, observou-se que os explantes foliares que não apresentaram responsividade nem sempre apresentavam oxidação concomitante (Fig. 1 B e C), mas os explantes que diferenciaram em brotações, oxidaram concomitantemente (Fig. 1 D-F).

Muitas brotações ficaram comprometidas pela contaminação fúngica (Fig. 1 F). Grande parte das contaminações têm origem endofítica, e neste caso consideramos se tratar de fungos rizoctonióides visto a origem da cultura ser simbiótica. Entretanto, folhas de orquídeas apresentam colonizações endofíticas comuns que apenas rizoctonióides (Bayman et al., 1997).

Tabela 1: Frequência da responsividade morfogênica de explantes foliares de *H. jongheana* induzidos à organogênese, aos 90 dias, em diferentes concentrações de BAP e ANA.

	FOLHA		RAIZ	
	SR (%)	Oxidação(%)	SR (%)	Oxidação(%)
B 0,0 A 0,0	14	98	100	100
B 1,0 A 0,5	14	95	100	100
B 2,0 A 1,0	28	97	100	100
B 4,0 A 2,0	40	85	100	100
B 6,0 A 3,0	28	37	100	100

Não houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

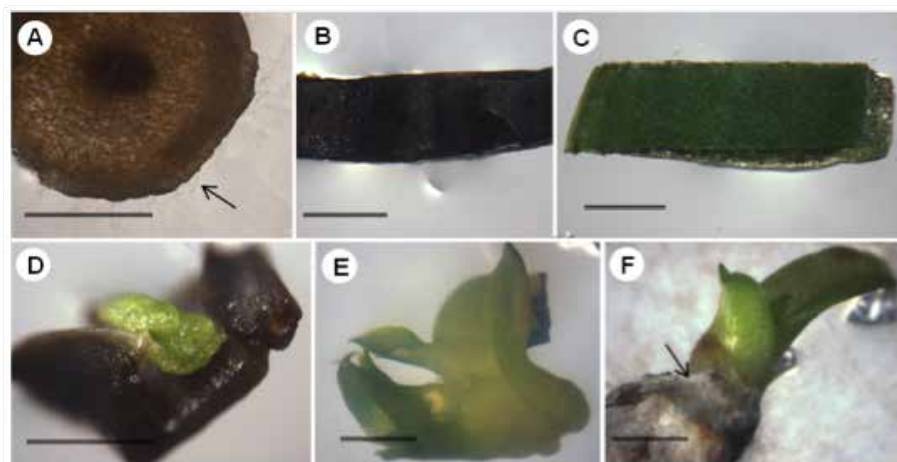


Figura 1: Indução à organogênese em *Hadrolaelia jongheana* cultivada simbioticamente, após 90 dias de cultivo. A: explante radicular, sem responsividade, oxidado, com hifas fúngicas emergindo do explante (seta); B: explante foliar oxidado; C: explante foliar sem responsividade; D: ápice caulinar em formação, meio B1A0,5; E: brotações formadas a partir do explante foliar em meio B4A2; F: brotação formadas a partir do explante foliar, observar a contaminação na base da brotação (seta). Barras: A-D= 1,0 mm; E-F= 2,0 mm.

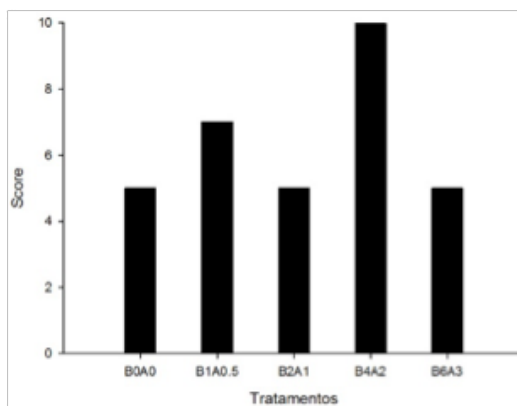


Figura 2: Frequência de organogênese, após 90 dias, em diferentes concentrações de ANA e BAP.

Conclusões

A utilização de explantes foliares, segmentados pela técnica de ThinCellLayer (TCL), é ideal para a propagação clonal de orquídeas. Entretanto as concentrações de reguladores de crescimento não induziram grande quantidade de brotações, além de que a utilização das culturas simbióticas tornou este processo limitado, devido ao grande número de contaminações. Portanto, ainda há a necessidade de se testar outros reguladores de crescimento e utilizar culturas axênicas para promover a propagação clonal massal de *Hadrolaelia jongheana*.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do CNPq, CAPES e da FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

BAYMAN, P.; LEBRÓN, L.L.; TREMBLAY, R.L.; LODGE, D.J. **Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae)**. New Phytol. 135, 143-149, 1997.

CRUZ, C.D. Genes- a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 35: 271-276, 2013.

DEARNALEY, J.D.W.. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*. 17, 475-486, 2007.