

# Efeito da Ventilação *in vitro* na Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição

Moema Cortizo Bellintani<sup>1,5</sup>, Carolina Cerqueira Lima<sup>2,5</sup>, Alone Lima Brito<sup>3,5</sup>, José Raniere Ferreira de Santana<sup>4,5</sup> e Ana Lúcia Cunha Dornelles<sup>6</sup>

## Introdução

*Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição é a mais nova espécie de *Orthophytum* descrita. Apesar de ser encontrada em uma Unidade de Conservação e de formar grandes populações, a ocorrência restrita ao município de Mucugê – Chapada Diamantina, leva a espécie à categoria vulnerável, o que demonstra a importância de trabalhos de preservação [1].

Métodos de cultura *in vitro* têm sido aplicados na conservação e multiplicação de genótipos específicos de bromélias. No entanto, a incapacidade de controlar a perda de água por transpiração e o mau funcionamento dos estômatos de plantas cultivadas *in vitro* afeta a capacidade de adaptação ao ambiente externo resultando frequentemente num baixo percentual de sobrevivência [2]. A ventilação dos frascos de cultura obtida através do uso de tampas permeáveis estimula o desenvolvimento de adaptações contra a perda de água resultando na produção de plantas com melhor controle da transpiração [3].

O meio de cultura utilizado para a micropropagação costuma conter carboidrato que possibilita o crescimento heterotrófico dos brotos. Kozai *et al.* [4] destacam a possibilidade de estimular a fotoautotrofia *in vitro*, reduzindo a quantidade de carboidrato fornecido e aumentando a intensidade luminosa do ambiente de cultivo. Alguns sistemas de micropropagação fotoautotróficos que envolvem a utilização de meios sem açúcar, ventilação forçada e exposição a altas intensidades luminosas têm mostrado resultados positivos, proporcionando um melhor desempenho das mudas no que tange crescimento, qualidade e sobrevivência [5].

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da forma de fechamento dos tubos e de diferentes concentrações de sacarose sobre a aclimatização de plantas de *O. mucugense* propagadas *in vitro*.

## Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em laboratório sob condição de crescimento de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo

de 16h e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , e posteriormente transferidos para viveiro a 70% de luminosidade.

A multiplicação *in vitro* foi realizada em meio MS [6] com metade da concentração salina (MS/2), suplementado com sacarose ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), BAP ( $2,2 \mu\text{M}$ ), ANA ( $0,65 \mu\text{M}$ ) e gelificado com ágar ( $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Como explantes foram utilizados segmentos de caule de *O. mucugense* procedentes de plantas germinadas *in vitro*. Os brotos produzidos, com parte aérea medindo entre 1cm e 2cm de altura foram transferidos para meio de cultura MS/2 gelificado com ágar e suplementado com carvão ativado ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os tubos foram vedados com PVC e mantidos em sala de crescimento durante 30 dias. Para cada uma das concentrações de sacarose utilizadas, 50% tubos foram novamente vedados com PVC e os outros 50% com algodão. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento por mais 30 dias. Para a determinação da água perdida por transpiração as plantas foram pesadas no momento da retirada dos tubos, e após 30 e 60 minutos de exposição às condições ambientais, sendo calculado o percentual de redução de peso fresco [7]. As plantas foram transferidas para substrato composto de vermiculita + terra (1:1), cobertas com garrafas “PET” (2L) tampadas, e mantidas em viveiro por 30 dias, quando as tampas foram retiradas. Decorridos dez dias as garrafas foram removidas. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada 100 dias após a transferência para o viveiro.

Amostras de tecido foliar foram coletadas no dia da transferência das plantas para o viveiro e 40 dias depois. As amostras foram retiradas da porção mediana, entre o bordo e a região central do limbo da primeira folha jovem recém-expandida do ápice da planta. O material fixado em álcool 70% foi seccionado transversalmente. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 20%, lavados em água destilada, corados com Azul de Astra 1% - Safranina 1%, 9:1 e montados em glicerina 50%. A presença de lignina foi confirmada com floroglucina clorídrica [8].

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2 (sacarose x selamento)

1. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana e Professora Assistente da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências. E-mail: mcbellintani@yahoo.com.br.

2. Estudante de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

3. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica e funcionária da Universidade Estadual de Feira de Santana.

4. Professor Adjunto da Universidade Estadual de Feira de Santana.

5. Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Horto Florestal - UEFS. Km 03, BR 116. Av. Universitária. Feira de Santana, BA. CEP 44031-460.

6. Professora Adjunta da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia da UFRRJ. BR-465, Km 7, Seropedica, RJ. CEP 23890-000.

Apoio financeiro: FAPESB.

com cinco repetições. Nos experimentos *in vitro* cada repetição foi formada por cinco tubos. Para avaliar a sobrevivência, cada repetição agrupou 10 plantas enquanto nos estudos histológicos, cada repetição consistiu nas medidas de espessura da parede celular de cinco células de cada folha. Os resultados avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

A interação “concentração de sacarose x tipo de selamento” influenciou significativamente a redução de peso fresco das plantas. Tubos tampados com algodão em qualquer uma das concentrações de sacarose utilizadas apresentaram plantas com redução de peso significativamente inferior que as mudas procedentes de tubos fechados com PVC em todos os momentos de avaliação. A redução de peso fresco em todos os tratamentos foi maior nos primeiros 30 minutos de exposição às condições ambientais. Após 60 minutos de exposição ao ambiente as plantas provenientes de tubos vedados com algodão (10,9%) tiveram uma redução total de peso quase 50% menor que as plantas oriundas dos tubos fechados com PVC (20,2%) (Tab.1).

A vantagem do selamento com algodão em relação ao método de fechamento tradicional demonstrou que as trocas gasosas, entre o microambiente *in vitro* e o ambiente externo, favoreceram o desenvolvimento de adaptações contra a perda de água por transpiração e, conseqüentemente, reduziram o estresse hídrico durante a fase de aclimatização.

As maiores espessuras de paredes celulares foram observadas para as células da epiderme adaxial (9,95 $\mu$ m) e abaxial (8,53 $\mu$ m) de folhas procedentes de tubos vedados com algodão. Nestas situações, a concentração de sacarose não influenciou de forma significativa na espessura da parede celular.

A avaliação da espessura da parede lignificada de células da epiderme foliar mostrou que no momento da transferência para o viveiro, as plantas procedentes de tubos vedados com PVC não apresentaram presença de lignina nem espessamento nas paredes das células da epiderme foliar abaxial ou adaxial em nenhuma das concentrações de sacarose (Tab. 2). Como a parede espessa e lignificada está associada com a proteção contra perda de água por transpiração [9], é natural que tenha sido observada uma grande redução de peso fresco em decorrência do fluxo transpiratório elevado presente nestas plantas. Folhas provenientes de plantas desenvolvidas em tubos fechados com algodão, apesar de não desenvolverem paredes espessas na ausência de sacarose, apresentaram paredes lignificadas em desenvolvimento. Estes resultados sugerem que o espessamento da parede de células epidérmicas não está diretamente relacionado com a exposição solar intensa como sugerido por Withner *et al* [10] e sim com a redução da umidade do ambiente. Como a umidade pode ser influenciada pela exposição ao sol, algumas correlações indiretas acabam por ser erroneamente atribuídas à irradiação solar.

Quando comparadas com mudas procedentes de culturas vedadas com PVC, as plantas oriundas de tubos tampados com algodão apresentaram uma menor perda de água, demonstrando possuir um maior controle da transpiração. Ocorre que as plantas cultivadas na ausência de sacarose, apesar de não apresentarem células da epiderme abaxial ou adaxial com paredes espessas e lignificadas, ainda assim mostraram comportamento semelhante às plantas procedentes de meio de cultura acrescido de 1,5 ou 3% de sacarose, no que tange a redução de peso fresco. Estes resultados indicam que nesta situação, outros fatores, como o controle estomático, podem estar associados ao controle da transpiração.

Plantas provenientes de tubos fechados com algodão apresentaram percentual de sobrevivência maior (95,4%) do que as provenientes de tubos vedados com PVC (80%). Relacionando a sobrevivência com a concentração de sacarose utilizada ainda na fase *in vitro*, os resultados mostram que a presença de sacarose favorece a sobrevivência quando as plantas são provenientes de tubos selados com PVC, mas não interfere de modo significativo na sobrevivência de plantas procedentes de tubos fechados com algodão (Tab. 3).

Este trabalho mostrou que a manipulação do ambiente *in vitro* possibilita a formação de plantas mais tolerantes ao estresse hídrico, favorecendo o processo de aclimatização, além de apresentar um método acessível e altamente eficaz, que garante o sucesso na aclimatização de mudas micropropagadas de *O. mucugense*, uma espécie recém descrita de bromélia, com grande valor ornamental.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Maria das Graças Lapa Wanderley pela identificação taxonômica da espécie estudada e a FAPESB pelo financiamento concedido ao projeto que resultou neste trabalho.

## Referências

- [1] WANDERLEY, M.G.L & CONCEIÇÃO, A.A. 2006. Notas taxonômicas e uma nova espécie do gênero *OrthoPHYtum* Beer (Bromeliaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 6(1): 03-08.
- [2] SEELYE, J.F.; BURGE, G.K.; & MORGAN, E.R. 2003. Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 53: 85-90.
- [3] SANTAMARIA, J.M.; MURPHY, K.P.; LEIFER, C. & LUMSDEN, P.J. 2000. Ventilation of culture vessels. II Increased water movement rather than reduced concentration of ethylene and CO<sub>2</sub> is responsible for improve growth and development of *Delphinium in vitro*. *The Journal of Horticultural Science e Biotechnology*, 75: 320-327.
- [4] KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. & ZIMMERMAN, R. (Eds.). *Micropropagation, technology and application* The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. P. 447-469.
- [5] ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C. & KOZAI, T. 2000. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. *Annals of Botany*, 85: 587-592.
- [6] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- [7] MILLS, D. & TAL, M. 2004. The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 209-216.

- [8] JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry*. San Francisco: Freeman. 408p.
- [9] TOMLINSON, P.B. 1969. Commelinales-Zingiberales. In: METCALF, C.R. (ed.). *Anatomy of the Monocotyledons*. Oxford: Clarendon Press. v.3. p. 1-446.
- [10] WITHNER, C.L.; NELSON, P.K. & WEJKSNORA, P.J. 1974. The anatomy of orchids. In: WITHNER, C.L. (Org.). *The orchids: scientific studies*. New York: J. Wiley, p. 267-334.

**Tabela 1.** Valores médios para redução de peso fresco (%) após 30 minutos, entre 30 e 60 minutos, e redução total 60 minutos depois da exposição às condições ambientais, em função do tipo de selamento e da concentração de sacarose utilizada.

Concentração de Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Até 30 minutos <sup>z</sup>		entre 30 e 60 min <sup>z</sup>		Total <sup>z</sup>	
	PVC	algodão	PVC	algodão	PVC	algodão
0	11,5 b <sup>w</sup> A <sup>v</sup>	7,7 a B	7,4 a A	2,9 b B	18,9 b A	10,7 a B
15	14,7 a A	7,1 a B	7,8 a A	4,1 a B	22,5 a A	11,2 a B
30	12,9 b A	8,0 a B	6,3 b A	3,0 b B	19,1 b A	11,0 a B
média	13,0 A	7,6 B	7,2 A	3,4 B	20,2 A	10,9 B

<sup>z</sup> – Médias originais. A estatística foi realizada em médias transformadas em arco seno.

<sup>w</sup> – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>v</sup> – Médias seguidas pela letra maiúscula em cada linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 2.** Valores médios para comprimento da parede lignificada ( $\mu\text{m}$ ) de células da epiderme adaxial e abaxial de folhas de *Orthophytum mucugense* no dia da remoção do laboratório (1<sup>o</sup> dia) e no 40<sup>o</sup> dia após a transferência para o ambiente em função do tipo de selamento e da concentração de sacarose utilizada.

Concentração de Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	1 <sup>o</sup> dia		40 <sup>o</sup> dia	
	Algodão	PVC	Algodão	PVC
	<b>Adaxial</b>			
0	0,00 c <sup>w</sup> A <sup>v</sup>	0,00 a A	9,68 a A	4,54 b B
15	1,04 b A	0,00 a B	9,76 a A	8,82 a A
30	4,22 a A	0,00 a B	10,41 a A	8,82 a B
Média	1,75 A	0,00 B	9,95 A	7,39 B
	<b>Abaxial</b>			
0	0,00 c A	0,00 a B	8,01 a A	5,07 b B
15	2,35 b A	0,00 a B	8,06 a A	8,27 a A
30	5,79 a A	0,00 a B	9,51 a A	7,10 a B
Média	2,71 A	0,00 B	8,53 A	6,81 B

<sup>w</sup> – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>v</sup> – Médias seguidas pela letra maiúscula em cada linha, para cada dia, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.** Valores médios para sobrevivência de *Orthophytum mucugense* 100 dias após a transferência para o viveiro, em função do tipo de selamento e da concentração de sacarose utilizada no experimento *in vitro*.

Concentração de Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	% sobrevivência <sup>z</sup>	
	PVC	algodão
0	54 b <sup>w</sup> B <sup>v</sup>	92 a A
15	92 a A	96 a A
30	94 a A	100 a A
média	80 B	95 A

<sup>z</sup> – Médias originais. A estatística foi realizada em médias transformadas em arco seno.

<sup>w</sup> – Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>v</sup> – Médias seguidas pela letra maiúscula em cada linha, para cada dia, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.