

## EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM FOLHAS DE *PHALAENOPSIS: ORCHIDACEAE.*

*Joice MINAMIGUCHI, Nelson Babosa MACHADO NETO*

### RESUMO

*Phalaenopsis* é um gênero de orquídeas largamente produzido para floricultura por apresentarem flores grandes e planas em hastas longas e de durabilidade elevada, além de serem de cultivo rápido e de alto valor comercial. Uma das vias de se propagar estas plantas é por meio de cultura de tecidos. Porém, mesmo com as mais refinadas técnicas de propagação clonal têm-se o aparecimento de calos, que podem, conseqüentemente, levar ao aparecimento de variantes somaclonais que, muitas vezes, não são interessantes. Visando minimizar a formação de calos, o protocolo de embriogênese somática foi testado em folhas de materiais comerciais, para a produção de embriões sem necessariamente passar pela fase de calo. Uma série de combinações entre NAA (ácido naftaleno acético; zero, 0,1 e 0,2mg L<sup>-1</sup>) e BAP (benzilaminopurina; zero, 1 e 2mg L<sup>-1</sup>) foi avaliada. O número de explantes mortos, fenolizados, sobreviventes e o número de embriões por explante foram analisados. As combinações de 0,1mg L<sup>-1</sup> ou 0,2mg L<sup>-1</sup> de NAA e 1mg L<sup>-1</sup> BAP foram os mais eficientes para a formação de embriões somáticos. Palavras chave: Embriogênese somática, cultura de tecidos, meio de cultura

### ABSTRACT

*Phalaenopsis* orchids are a largely produced floriculture genus due to their large, flat, highly variable in coloured and durable flowers arranged in long branches. They are fast growing plants and highly valuable. One of the propagation ways is the tissue culture. However, even with the finest propagation techniques of clone propagation may produce calluses and consequently may lead to somaclonal variation, an undesirable side effect. To minimize calluses formation a protocol of embryogenesis was tested in leaves of commercial plants. A series of combination between NAA and BAP was tested. The number of dead, oxidized, surviving and embryos per explant was analyzed. The combinations of 0.1mg L<sup>-1</sup> of or 0.2mg L<sup>-1</sup> of NAA and 1mg L<sup>-1</sup> BAP was the most effective to induce embryo formation. Key-Words: Somatic embryogenesis, tissue culture, culture media

## INTRODUÇÃO

O comércio de orquídeas, como planta de vaso ou flor de corte, é bastante significativo, sendo que nos EUA, no ano de 2002, foi a segunda planta ornamental de vaso mais vendida com 12,7 milhões de unidades (US\$106.000.000,00) ficando atrás apenas de Bico-de-papagaio (*Poinsettia*) (US\$247.000.000,00) e acima dos *Crisanthemums* (US\$ 77.000.000,00) (AMERICAN ORCHID SOCIETY, 2003) e este mercado cresceu significativamente, chegando em 2005 à US\$144.000.000,00 (AMERICAN ORCHID SOCIETY, 2006). No Brasil, estimativas orçam em R\$107.000.000,00 (aproximadamente US\$33.000.000,00) o mercado de orquídeas em flor e em vaso, sendo que apenas o estado de São Paulo corresponderia a metade deste montante.

O gênero *Phalaenopsis* é originário do sudeste asiático preferindo temperaturas entre 18 e 28 graus centígrados, destacando-se pelas suas flores exóticas, pela alta contagem floral e pela duração das flores que é responsável pela popularidade dos gêneros. Para os produtores é uma das orquídeas mais precoces chegando ao mercado mais cedo, sendo, portanto uma ótima opção.

As plantas de *Phalaenopsis* são monopodiais, alternifolias, terminando sempre em um meristema vegetativo, com inflorescências nas axilas foliares. As flores são achatadas com labelo curto e as pétalas são menores que as sépalas, formando agradáveis conjuntos de flores ovaladas ou arredondadas do banco puro até o violeta intenso, passando por diversas matizes de amarelo puro ou manchado. Sua propagação vegetativa é lenta, pois a formação de brotos laterais não é comum, sendo a reprodução por semente preferida. Por ser uma planta monopodial, onde o crescimento ocorre num caule único, o meristema apical cresce continuamente e o uso deste em propagação *in vitro* é extremamente prejudicial para a planta, podendo levá-la a morte.

O cultivo de orquídeas como plantas ornamentais começou por volta do século XIX (BLACK, 1984) e as plantas eram quase que exclusivamente oriundas de coletas nas América e Ásia tropicais, sendo que as plantas sobreviventes eram multiplicadas por divisões ou por sementes que geravam uns poucos indivíduos (KNUDSON, 1922). Em 1943, as soluções nutritivas para a cultura de plantas foram estabelecidas (KNUDSON, 1943), sendo que apenas em 1946 um meio eficiente para a germinação *in vitro* de *Cattleyas* e alguns gêneros aparentados foi descrito (KNUDSON, 1946). Após este evento, a propagação em larga escala, via sementes, acarretou um grande aumento na multiplicação destas plantas e conseqüentemente no melhoramento das mesmas, seja por hibridação, seja por seleção dentro das espécies.

Com a possibilidade da clonagem de plantas a partir de células somáticas, o sonho do botânico austro-húngaro, Gottlieb Haberlandt, se tornou realidade. Em 1902, ele publicou a sua idéia sobre o princípio da "Teoria da Totipotência" que, profeticamente, postulou que os seres vivos têm capacidade de regenerar seus corpos inteiros a partir de células únicas. Nem ele nem os seus discípulos, calcularam que suas tentativas abririam novos horizontes para a humanidade, o que atualmente é aplicado na biotecnologia vegetal.

Morel (1960) clonou as primeiras plantas através de meristemas de crescimento em *Cymbidium*, abrindo uma grande possibilidade para a técnica da clonagem *in vitro* de plantas, o que só é possível mediante a cultura de tecidos. Essa técnica se fundamenta na totipotência das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênese ou embriogênese somática (MANTELL, 1984).

Todavia a propagação de determinados clones de híbridos ou de espécies é altamente desejável, mas esbarra muitas vezes na imprecisão genética da técnica ou na dificuldade de se trabalhar com a mesma. A propagação via meristemas é hoje responsável pelo alto desenvolvimento da floricultura

e em especial da orquidicultura, uma vez que estas técnicas permitiram baratear os custos de produção, pois podem produzir milhares de plantas idênticas. Todavia, o uso de meristemas permite que se produza, com maior rigor genético, de 300 a 500 plantas. O uso de embriogênese somática possibilitaria o uso de partes vegetativas do indivíduo sem que, necessariamente, estes tivessem seus meristemas retirados e viessem a perecer.

Embriogênese somática ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão gamética (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Dois padrões básicos da expressão da embriogênese somática ocorrem *in vitro* (SHARP et al., 1980). O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências medidas por mensageiros químicos e específicos.

A propagação destas plantas, via cultura de tecidos, apesar de não ser difícil e poder ser feita de várias maneiras (ISHII et al., 1998, TOKUHARA e MII, 1993, 1998, 2001 e 2003) pode levar a variação somaclonal, que apesar de ser uma fonte de variação não é desejável comercialmente.

O objetivo deste trabalho foi de estabelecer parâmetros para a embriogênese em segmentos de folhas de *Phalaenopsis*, o que poderia permitir clonar uma planta, sem destruí-la.

## MATERIAL E MÉTODOS.

O experimento foi realizado na UNOESTE, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Utilizaram-se folhas novas de *Phalaenopsis* ainda *in vitro* oriundas de clonagem de um híbrido de flores albas. As folhas foram seccionadas ao meio retirando-se as bordas, deixando-se segmentos de aproximadamente 1,5cm<sup>2</sup>. Como as plantas de *Phalaenopsis* apresentam um processo de fenolização muito forte as folhas foram cortadas em Placa-de-Petri em uma solução autoclavada de cistina e ácido ascórbico (0,5g L<sup>-1</sup> de cada) para diminuir os problemas que levam a oxidação de alguns compostos, gerando compostos tóxicos para o tecido levando o explante à morte.

O meio utilizado foi o NDM (New Dogashima Medium) composto pelos seguintes sais (em massa por litro): 480mg de Nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 200mg de Nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), 470mg de Nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 250mg de Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 3mg de Sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>), 150mg de Cloreto de potássio (KCl), 550mg de Fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 21 mg de FeEDTA, 0,5mg de Sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>), 0,5mg de Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 0,025mg de Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), 0,025mg de Molibdato de sódio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>), 0,025mg de Cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), 100mg de mioinositol, 1 mg das vitaminas niacina, piridoxina, tiamina, pantotenato de cálcio e cisteína e 0,1mg de Biotina (TOKUHARA e MII, 1993) contendo 20g L<sup>-1</sup> de sacarose, gelificados com 2g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e ajustados para pH 5,8, em um desenho experimental de 3 doses de ácido naftaleno acético (NAA) por três doses de Benzilaminopurina.(BAP) com 6 repetições por tratamento, contendo 2 explantes por frasco (Tabela 1).

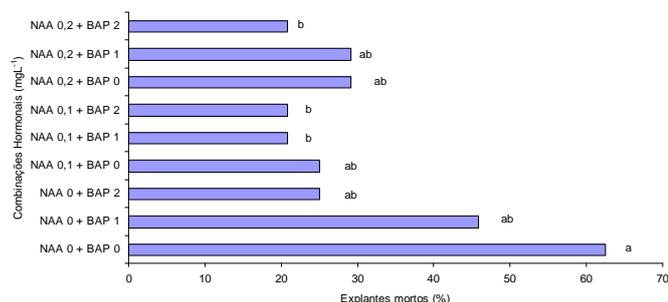
**Tabela 1.** - Combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (Benzilaminopurina) utilizadas para embriogênese de *Phalaenopsis*. Presidente Prudente, 2006.

Tratamentos	NAA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
1	0	0
2	0	1
3	0	2
4	0,1	0
5	0,1	1
6	0,1	2
7	0,2	0
8	0,2	1
9	0,2	2

O desenho experimental foi totalmente casualizado e os dados de percentagem de explantes mortos, fenolizados, sobreviventes e número de embriões por explante foram transformados em  $(x+0,5)^{1/2}$  e submetidos à análise de variância (teste F), aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. Utilizou-se o software SISVAR para o processamento dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

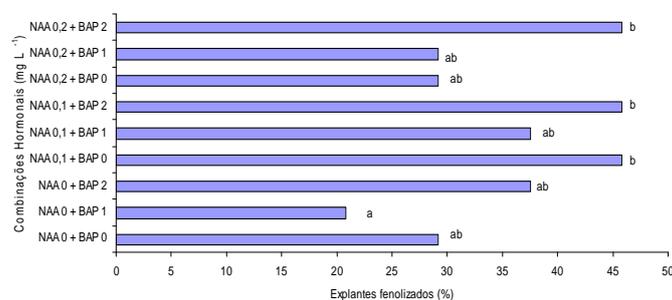
Os dados obtidos no presente trabalho são apresentados nas figuras abaixo.



**Figura 1** - Porcentagem de mortalidade de explantes foliares de *Phalaenopsis* cultivadas em nove combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (benzilaminopurina). Médias seguidas por letras semelhantes não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de significância.. Presidente Prudente, 2006.

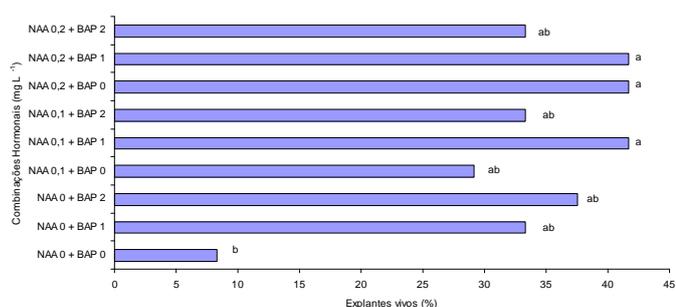
A Figura 1 mostra o resultado das combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (benzilaminopurina) em

nove tratamentos, onde podemos observar que no tratamento 1 (NAA 0 + BAP 0), houve a maior mortalidade. A ausência de NAA (tratamentos 1, 2 e 3) apresentou a maior percentagem de mortalidade, contudo o tratamento 3 (NAA 0 + BAP 2) não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Os demais tratamentos não diferiram significativamente.



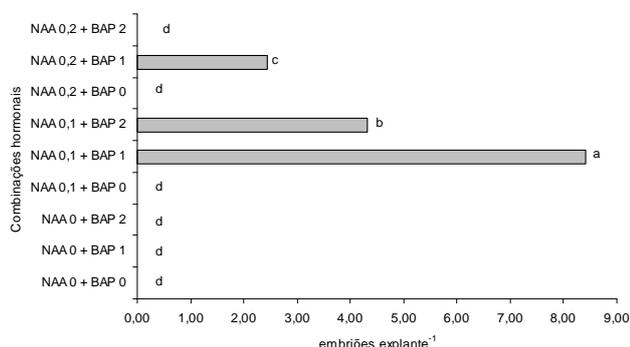
**Figura 2** - Porcentagem de fenolização de explantes foliares de *Phalaenopsis* cultivadas em nove combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (benzilaminopurina). Médias seguidas por letras semelhantes não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de significância. Presidente Prudente, 2006.

*Phalaenopsis* é um gênero de orquídeas que apresentam grande fenolização de tecidos quando estes são submetidos a danos. Os explantes quando submetidos a cultura de tecidos e apresentaram uma maior fenolização nos tratamentos onde a dosagem de BAP foi de 2mg L<sup>-1</sup> combinados com qualquer dose de NAA. A menor taxa de fenolização foi atingida com zero de NAA e 1mg L<sup>-1</sup> de BAP.



**Figura 3** - Porcentagem de sobrevivência de explantes foliares de *Phalaenopsis* cultivadas em nove combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (benzilaminopurina). Médias seguidas por letras semelhantes não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de significância. Presidente Prudente, 2006.

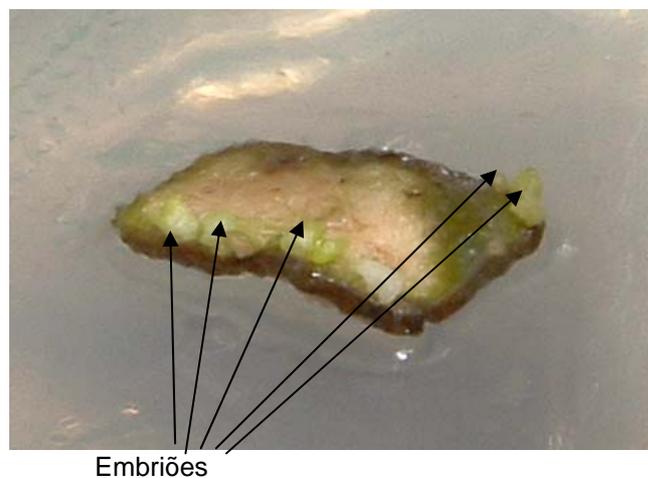
Houve uma maior porcentagem de explantes sobreviventes em tratamentos (Figura 3) onde havia a dosagem de 1 de BAP. Para o tratamento 1 (NAA 0 + BAP 0), a ausência de hormônios leva a menor taxa de sobrevivência. O aumento das doses de NAA afeta positivamente a sobrevivência dos explantes foliares.



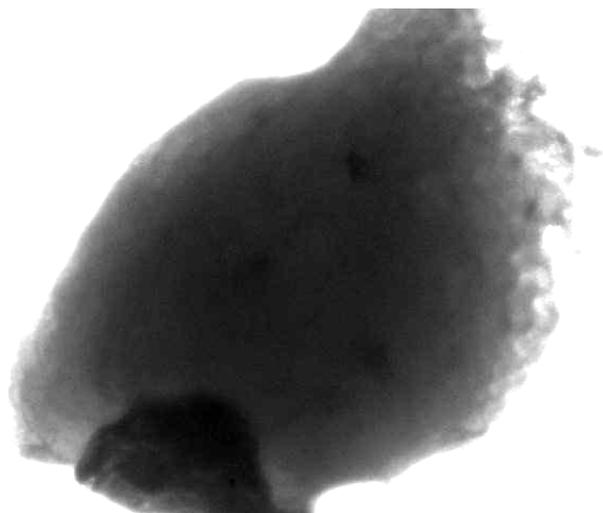
**Figura 4** - Número de embriões somáticos formados por explante foliar de *Phalaenopsis* cultivadas em nove combinações de NAA (ácido naftaleno acético) e BAP (benzilaminopurina). Médias seguidas por letras semelhantes não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de significância. Presidente Prudente, 2006.

Os melhores tratamentos na formação de embriões (Figura 4) foram o tratamento 5 (0,1mg L<sup>-1</sup> NAA e 1mg L<sup>-1</sup> BAP), 6 (0,1mg L<sup>-1</sup> NAA e 2mg L<sup>-1</sup> BAP) e o tratamento 8 (0,2mg L<sup>-1</sup> NAA e 1mg L<sup>-1</sup> BAP). Os demais não diferiram significativamente. Explantes mantidos em apenas um dos hormônios não conseguiram produzir embriões somáticos.

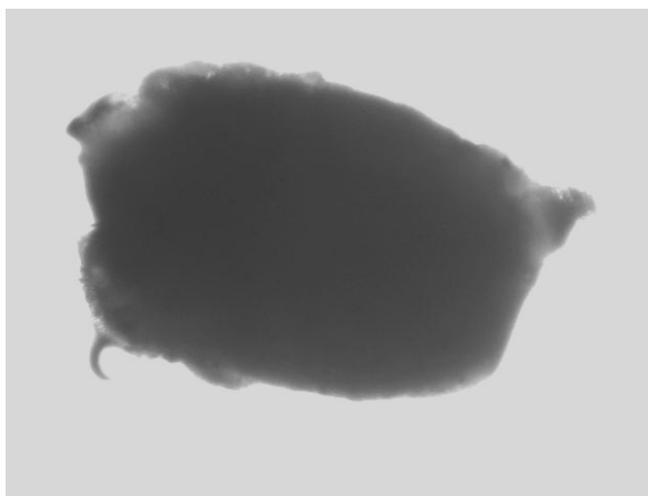
As auxinas são estimulantes das divisões celulares, sendo o NAA um análogo da auxina natural IAA (Ácido 3 Indolil acético) e têm efeito quando aplicados isoladamente na indução da formação de sistemas radiculares. As citocininas, como o BAP, também estão relacionadas à divisão celular, contudo, induzem grandemente a formação de parte aérea, e ambos fitorreguladores, quando em doses abaixo do adequado, não surtem o efeito desejado sobre os tecidos, bem como em doses mais elevadas, podem induzir a toxidez e atuar como herbicidas. A combinação das doses exatas dos dois fitorreguladores é necessária para a indução embriogênica sem que haja a formação de calos, ou que esta seja minimizada. Os tratamentos 5, 6 e 8 foram os que conseguiram formar embriões diretamente em folhas novas (Figura 5). Todavia, estes embriões (Figuras 6 e 7) não terminaram seu desenvolvimento dado a fenolização dos explantes e do meio de cultura. Apesar de resultados anteriores terem sido positivos para embriogênese somática indireta a partir de gemas axilares de hastes florais (TOKUHARA e MII, 1993, 1998, 2001 e 2003) o mesmo não acontece com tecido foliar. Apesar de baixa frequência houve embriogênese direta em tecido foliar, o que pode reduzir os problemas de variação somaclonal.



**Figura 5** - Embriões somáticos em folha de *Phalaenopsis* (0,1 NAA e 1 BAP mg L<sup>-1</sup>). Presidente Prudente, 2006.



**Figura 6-** Embrião do tratamento (0,1 NAA e 1 BAP mg L<sup>-1</sup>). Presidente Prudente, 2006.



**Figura 7** -Embrião do tratamento (0,1 NAA e 1 BAP mg L<sup>-1</sup>). Presidente Prudente, 2006.

O meio NDM, mesmo com concentrações variadas, permite a formação de embriões somáticos em folhas novas de *Phalaenopsis*, porém as condições precisam ser melhoradas para a sobrevivência e o desenvolvimento dos embriões somáticos.

## CONCLUSÕES

O meio contendo 0,1mg L<sup>-1</sup>NAA e 1mg L<sup>-1</sup>BAP foi o mais eficiente na produção de embriões de *Phalaenopsis* a partir de tecido foliar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMERICAN ORCHID SOCIETY. Business is Booming. *Orchids*, v.72, p.567-567, 2003.
- AMERICAN ORCHID SOCIETY. Orchid popularity still growing. *Orchids*, v.75, p.563, 2006
- BLACK, P. M. Orquídeas. Ao Livro Técnico S/A, Rio de Janeiro, 1984.
- ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M. e TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*, *Plant Cell Reports*, v. 17, p.446-450, 1998. <http://dx.doi.org/10.1007/s002990050423>
- KNUDSON, Lewis Nutrient solutions for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, v.12, p. 77-79, 1943.
- KNUDSON, Lewis. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, v.15, p. 214-217, 1946.
- KNUDSON, Lewis. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, v.73, p.1-25, 1922. <http://dx.doi.org/10.1086/332956>
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A. e McKEE, R.A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas**. Ribeirão Preto. 1994. 333p.
- MOREL, George. Producing virus free Cymbidium. *American Orchid Society Bulletin*, v.29, p.495-497, 1960.
- SHARP, W. R.; SONDAHL, M., CALDAS, LS. e MARAFFA, S.B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural reviews*, v.2, p.268-310, 1980.
- TOKUHARA, K. e MII, M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In vitro, cell development biol. - Plant*, v.39, p.635-639, 2003.
- TOKUHARA, K e MII, M. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* Orchidaceae. *In vitro, cell development biol. - Plant*, v.37, p.457-461, 2001.
- TOKUHARA, K e MII, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot

tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports**, v.13, p.7-11, 1993. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00232306>

TOKUHARA, K. e MII, M. Somaclonal variations in flower and inflorescence axis in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. **Plant biotechnology**, v.15, p.23-28, 1998.

WILLIAMS, E.S. e MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as embryogenesis. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.