

# REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

## REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *CYRTOPODIUM PARANAENSE* SCHLTR (ORCHIDACEAE) A PARTIR DE REGIÕES MERISTEMÁTICAS<sup>1</sup>

Larissa Aline Bellaver<sup>2</sup>, Karina Mikie Miyake Kato<sup>2</sup>, Sabrina Buttini<sup>3</sup>, Daniela Antonietti<sup>3</sup>,  
Susiane Galli<sup>4</sup> e Suzana Stefanello<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Aceito para publicação no 2º Trimestre de 2015.

<sup>2</sup>Acadêmicas do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina/PR. larissabellaver@gmail.com, kah.miyake@gmail.com

<sup>3</sup>Graduadas em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina/PR, sabrina.buttini@ufpr.br, daniantonietti@ufpr.br

<sup>4</sup>Bióloga do Departamento de Biodiversidade, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina/PR, susianagalli@ufpr.br

<sup>5</sup>Profª Drª Adjunta do Departamento de Biodiversidade, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina/PR, sstefanello@ufpr.br

### **Resumo**

Devido a exploração irregular das orquídeas, muitas delas se encontram ameaçadas de extinção. Na tentativa de que a proliferação destas plantas seja garantida utilizam-se técnicas de cultivo *in vitro*. A utilização de regiões meristemáticas para a produção de protocormóides e posterior regeneração de plantas tem sido empregada com sucesso para diferentes espécies. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da utilização dos reguladores de crescimento ANA e BAP na formação de protocormóides a partir de ápices radiculares e segmentos foliares de *Cyrtopodium*

*paranaense*. Os explantes foram seccionados e inoculados em meio de cultura MS suplementado com concentrações de ANA (0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>) e BAP (0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>) totalizando 9 tratamentos. Os meios de cultura foram acrescidos de sacarose (30 g. L<sup>-1</sup>), geleificados com ágar (6,5 g. L<sup>-1</sup>). O experimento foi inteiramente casualizado, a unidade experimental constou de um vidro contendo sete explantes, com quatro repetições. Após a inoculação os frascos foram levados para B.O.D. com temperatura de 24° ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. Semanalmente avaliou-se o aparecimento de modificações morfológicas como formação de calos e protocormóides. Na segunda semana de cultivo foi observada a formação de calos friáveis e esbranquiçados na extremidade seccionada dos ápices radiculares em todos os tratamentos. Os ápices foliares não apresentaram respostas morfogenéticas e secaram progressivamente. Após 180 dias de cultivo o número médio de protocormóides por explante foi maior nos tratamentos com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

**Palavras-chave:** propagação *in vitro*, protocormóides, orquídeas.

### ***IN VITRO* REGENERATION OF *Cyrtopodium paranaense* SCHLTR (ORCHIDACEAE) FROM MERISTEMATIC REGIONS**

#### **Abstract**

The illegal exploitation of orchids has placed many species in danger of extinction. *In vitro* culture techniques have been used in an attempt to guarantee the proliferation of these plants. Explants excised from meristematic regions have been successfully used to produce protocorm-like-bodies and subsequent plant regeneration of different species. The objective of this study was to evaluate the effect of the growth regulators NAA and BAP in the formation of protocorm-like-bodies from root tips and leaf segments of *Cyrtopodium paranaense*. The explants were excised and inoculated into MS medium supplemented with naphthalene acetic acid (NAA) (0, 0.5 and 1 mg L<sup>-1</sup>) and benzylaminopurine (BAP) (0, 0.5 and 1 mg L<sup>-1</sup>), totaling nine treatments. The culture media were supplemented with sucrose (30 g. L<sup>-1</sup>) and agar (6.5 g. L<sup>-1</sup>). The experiment was arranged in a completely randomized design and the experimental unit consisted of a jar containing seven explants, with four replications. After inoculation, the flasks were

brought to a B.O.D. with temperature of  $24 \pm 2$  °C and photoperiod of 16 hours. The occurrence of morphological changes, with formation of calli and protocorm-like-bodies, was assessed weekly. In the second week of culture, friable and whitish calli were observed on the cut ends of the root tips for all treatments. Leaf apices showed no morphogenetic responses and dried gradually. After 180 days of *in vitro* culture, the average number of protocorm-like-bodies per explant was higher in the treatments with  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  BAP and  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA and  $1 \text{ mg. L}^{-1}$  BAP.

**Keyword:** *in vitro* propagation, protocorm-like-bodies, orchids.

## Introdução

A família Orchidaceae é conhecida como uma das maiores entre as Angiospermas, possuindo cerca de 24.500 espécies e 800 gêneros (DRESSLER, 2005). No Brasil, foram encontrados 238 gêneros e 2.553 espécies (BARROS *et al.*, 2011). São conhecidas como plantas de diferentes tamanhos, forma e cor dos caules, folhas e flores, sendo cultivadas, principalmente, para finalidades ornamentais (TOMBOLATO, COSTA, 1998).

Nos últimos anos, muitas populações naturais de orquídeas têm sido afetadas pela exploração antrópica excessiva ocasionada pela destruição de seus habitats naturais ou da coleta predatória (ARDITTI, 1992). Além disto, são plantas de difícil propagação pela exigência de germinação das sementes, com pouca ou nenhuma reserva, que necessitam da associação mutualística com fungos micorrízicos (STOUTAMIRE, 1964; ROBERTS, DIXON, 2008).

Incluída na lista de espécies da flora do Estado do Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA, 2003) está a espécie *Cyrtopodium paranaense*, uma orquídea tropical de notável potencial ornamental, de hábitos terrestres e rupícolas encontrada na região litorânea do Sul e Sudeste brasileiro (BARROS *et al.*, 2011). Há relatos da utilização farmacológica de seus pseudobulbos na cicatrização de ferimentos (VIEIRA *et al.*, 2000) e ensaios exploratórios da atividade cicatrizante sobre linhagens de fibroblastos de pele humana estão em andamento, bem como trabalhos visando a determinação fitoquímica destes extratos (SILVA *et al.*, 2013).

Dentre os métodos de multiplicação de plantas, a propagação *in vitro* se destaca por possibilitar a obtenção de mudas com excelente qualidade, atendendo as exigências do mercado e ainda como forma de garantir a multiplicação de espécies em perigo de extinção.

A cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro* de orquídeas resulta em maiores percentuais de germinação do que em condições naturais (MARTINI *et al.*, 2001) e as plantas obtidas podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas, bem como para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento (FERREIRA, SUZUKI, 2008). Se a germinação for assimbiótica o desenvolvimento ocorre de forma similar ao observado em condições naturais, desde que o meio de cultura seja suplementado com uma fonte adequada de carboidrato (HARRISON, 1974), porém em menor período de tempo e com elevadas taxas de germinação.

As sementes de orquídeas possuem um padrão uniforme de germinação e desenvolvimento que inicia com o intumescimento que leva ao rompimento seminal e a liberação do embrião, o qual se desenvolve em uma estrutura tuberiforme chamada protocormo (ARDITTI, 1992).

Quando em condições adequadas de meio de cultura, regiões meristemáticas das raízes e folhas jovens podem induzir a formação de calos e estruturas semelhantes a protocormos, os protocormóides (originalmente chamados “protocorm-like-bodies”), permitindo a produção em larga escala de plantas superiores (CHEN, CHANG, 2002; KERBAUY, 2004). Em muitos casos, a suplementação do meio nutritivo com substâncias reguladoras de crescimento, principalmente auxinas e citocininas, é essencial influenciando o crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro* (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998).

Contudo, poucos são os estudos de propagação *in vitro* para a espécie (REGO-OLIVEIRA, FARIA, 2005; GUO *et al.*, 2010).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de substâncias reguladoras de crescimento na regeneração *in vitro* de *C. paranaense* a partir de ápices radiculares e segmentos foliares.

## **Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina no período de outubro de 2014 a abril de 2015.

Ápices radiculares (1 cm) e segmentos foliares (1 cm) de *C. paranaense* retirados de plantas previamente germinadas *in vitro* (Figura 1a) foram utilizados como explantes. Os mesmos foram seccionados e inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS suplementados com Ácido Naftlaenoacético - ANA (0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>) e Benzilaminopurina - BAP ( 0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup>), totalizando nove tratamentos. Os meios de cultura foram acrescidos de sacarose (30 g. L<sup>-1</sup>), geleificados com ágar (6,5 g. L<sup>-1</sup>) e com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após 80 dias de cultivo foi realizado subcultivo para o meio de cultura MS isento de reguladores.

O experimento foi inteiramente casualizado, a unidade experimental constou de um vidro contendo sete explantes, com quatro repetições. Após a inoculação os frascos foram levados para B.O.D. com temperatura de 24° ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

Semanalmente avaliou-se o aparecimento de modificações morfológicas como formação de calos e protocormos. Após 180 dias de cultivo avaliou-se o percentual de explantes com protocormóides e o número médio de protocormóides por explantes.

## Resultados e discussão

Na segunda semana de cultivo foi observada a formação de calos friáveis e esbranquiçados na extremidade seccionada dos ápices radiculares em todos os tratamentos (Figura 2a). O mesmo não ocorreu com os segmentos foliares que foram secando progressivamente.

A formação de protocormóides pode ser observada a partir dos 75 dias de cultivo (Figura 1c) nos tratamentos: T1 (0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP); T2 (0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP); T3 (0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP); T6 (0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) e T9 (1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP).

Após 180 dias de cultivo os maiores percentuais de explantes com protocormóides foram obtidos nos tratamentos onde o meio de cultura não foi suplementado com ANA (Tabela 1). Entretanto, o número médio de protocormóides por explante foi maior nos tratamentos com 0,5

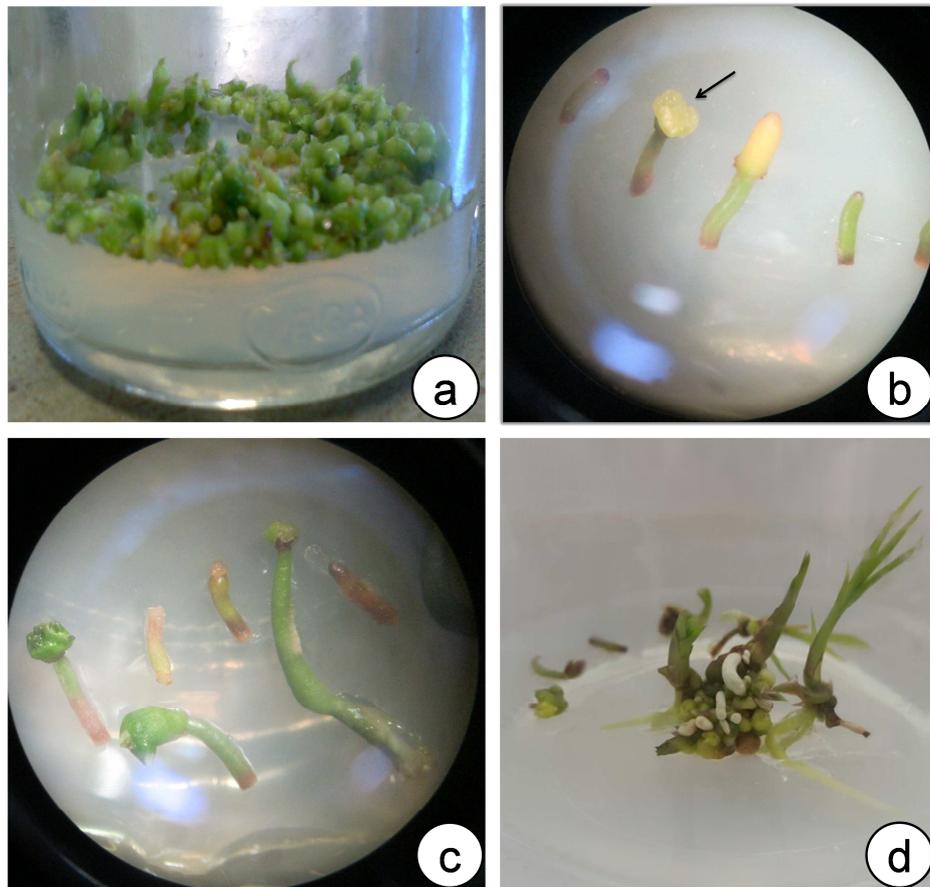
mg.L<sup>-1</sup> de BAP (5,5 protocormóides) e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (12 protocormóides) (Figura 1d), ou seja, quando houve a adição de certas quantidades de citocinina.

**Tabela 1.** Regeneração de protocormóides *in vitro* de *C. paranaense* nos diferentes tratamentos com ANA e BAP a partir de ápices radiculares após 180 dias de cultivo.

Tratamentos	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )		Ápices radiculares	
	ANA	BAP	Percentual de explantes com protocormóides	Número médio de protocormóides por explante
T1	0	0	57,6	4
T2	0	0,5	50,3	5,5
T3	0	1	57,1	2
T4	0,5	0	0	0
T5	0,5	0,5	14,2	2
T6	0,5	1	28,5	12
T7	1	0	0	0
T8	1	0,5	0	0
T9	1	1	14,3	4

Kerbaux (2004) relatou que em certas espécies de *Catasetum* a conversão *in vitro* de ápices de raízes em protocormóides ocorre diretamente nos ápices meristemáticos e, em outras espécies como *Oncidium varicosum* a regeneração é do tipo secundária, ou seja, os protocormóides formam-se sobre massas de células (calos) originados dos ápices inoculados.

Diferentes substâncias reguladoras de crescimento têm sido empregadas na indução de protocormóides a partir de ápices radiculares em diferentes espécies de orquídeas e dependendo da sua concentração, as citocininas tem se mostrado mais efetivas do que as auxinas neste processo.



**Figura 1.** a) Frasco contendo protocormos de *C. paranaense* obtidos através da germinação *in vitro*; b) Calos (seta) formados a partir de ápices radiculares em  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP aos 15 dias de cultivo; c) Iniciação dos protocormóides com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP aos 75 dias; d) Protocormóides formados em  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP após 180 dias de cultivo. Imagens b e c registradas em estereomicroscópio – aumento 20x.

Peres e Kerbauy (1999), estudando as relações entre citocininas e a auxina Ácido Indolacético (AIA) endógenas na conversão de ápices radiculares seccionados de *Catasetum fimbriatum* em protocormóides, verificaram uma alteração no balanço entre estes hormônios, favorável às citocininas.

Guo *et al.* (2010) observaram a regeneração de protocormóides de *C. paranaense* a partir de ápices radiculares cultivados na ausência de luz, em meio de cultura MS suplementado com combinações da auxina AIA e da citocinina TDZ (Thidiazuron). Os autores observaram os maiores percentuais de explantes com protocormóides (100%) quando os níveis de AIA foram

superiores aos de TDZ, enquanto na ausência de AIA não ocorreu a indução. Os protocormóides proliferaram e regeneraram plantas em meio de cultura MS isento de reguladores. Estes resultados diferem do presente trabalho onde a formação de protocormóides ocorreu com o cultivo na presença de luz e com maiores níveis da citocinina BAP.

A suplementação do meio de cultura com BAP ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) também foi eficiente na formação de protocormóides de *Aerides maculosa* Lindl. porém a partir de segmentos de folhas jovens de plantas crescidas *in vitro* (MURTHY, PYATI, 2001). O subcultivo dos protocormóides em meio de cultura MS sem reguladores permitiu a diferenciação dos mesmos em plantas.

A adição de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  da auxina sintética 2,4-D (Ácido diclorofenoxiacético) teve um efeito marcante na formação de massas nodulares que, posteriormente, originaram protocormos em *Miltonia flavescens*, espécie de orquídea nativa da região Sul do Brasil (STEFANELLO *et al.*, 2009). Sua combinação com BAP ( $1$  ou  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi importante pois incrementou a indução de massas nodulares tanto a partir de segmentos foliares quanto de ápices radiculares.

## Conclusões

A combinação de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP proporcionou maior regeneração *in vitro* de plantas de *C. paranaense* a partir de ápices radiculares.

## Referências

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 641p.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FOSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. *Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 07 Jul. 2015.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* Gower Ramsey. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 41-44, 2002.

DRESSLER, R.L. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26, p. 155-158, 2005.

FERREIRA, W.V.; SUZUKI, R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, I.G.; LICHSTON, J.E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, p.67-68., 2008.

FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA. **Lista final das espécies da flora ameaçadas - RS**. 2003. [http://www.fzb.rs.gov.br/upload/1396360713\\_flora\\_ameacada.pdf](http://www.fzb.rs.gov.br/upload/1396360713_flora_ameacada.pdf). Acesso em: 08 Jul. 2015.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH, 1998. p. 183-260.

GUO, W. L.; CHANG, Y. C. A.; KAO, C. Y. Protocorm-like bodies initiation from root tips of *Cyrtopodium paranaense* (Orchidaceae). **HortScience**, v. 45, p. 1365- 1368, 2010.

HARRISON, C. R. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, v. 138, p. 41-45, 1977.

KERBAUY, G.B. Estágio atual do emprego de técnicas biotecnológicas para pesquisa em plantas orquídeas. In: BARROS, F.; KERBAUY, G.B. (Org.) **Orquidologia sul-americana: uma compilação científica**. São Paulo: SMA, p. 51-58, 2004.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.G.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1319-1324, 2001.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MURTHY, H.; PYATI, A. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, Wallingford, v. 37. n. 2, p. 223-226, 2001.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n.1, p.1-5, 2005.

ROBERTS, D.L.; DIXON, K.W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, p. 325-329, 2008.

SILVA, A. G.; BOLDRINI, R. F.; KUSTER, R. M. Os sumarés da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). **Natureza Online**, v. 11, n. 3, p. 152 -154, 2013.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MULLER, T.S.; TOMCZAK, A.P.; BONETT, L.P.; SCHUELTER, A.R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

STOUTAMIRE, W.P. Seeds and seedlings of native orchids. **Michigan Botanist**, v. 3, p. 107-119, 1964.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**, p.49-52. IAC. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. (Boletim Técnico, 174).

VIEIRA, A.C.M.; SOARES, A.P.C.; LAINETTI, R. Pharmacognostic study of Sumaré – *Cyrtopodium paranaense* Schltr (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 81, p. 11-13, 2000.