

Aplicação de biotecnologia vegetal para padronização de plantas ornamentais

Application of vegetable biotechnology for ornamental plants standardization

Fernanda Kelly **MEZZALIRA**^{1,2}

RESUMO

A clonagem é uma ferramenta utilizada para propagar materiais vegetais, garantindo que as plantas regeneradas sejam geneticamente idênticas à matriz desejada. Sabe-se que o setor de plantas ornamentais contribui de maneira expressiva com a economia e que, entre as plantas ornamentais de mais estima entre os brasileiros, estão as orquídeas. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de assepsia eficiente para meristemas laterais e de obtenção de clones da orquídea do gênero *Phalaenopsis*. Para a metodologia, visando à padronização de um protocolo de assepsia, foram elaborados e testados quatro tratamentos com diferentes combinações (concentração × tempo) de agentes como hipoclorito de sódio, álcool, cobre, *tween* e lavagem dos explantes. Os meristemas foram retirados do caule das plântulas, de suas hastes florais. Os resultados obtidos mostram que nenhum tratamento para assepsia testado aqui apresentou resultados significativos e positivos. Desse modo, não se pôde estabelecer, ainda, um protocolo de assepsia para meristemas laterais de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, uma vez que todos os meristemas sofreram contaminação e oxidação. Logo, ainda não foi possível obter clones por essa metodologia. O presente trabalho serve como base inicial para futuras pesquisas referentes à clonagem por meio de meristemas em *Phalaenopsis*.

Palavras-chave: clonagem; cultivo *in vitro*; economia; meristemas; *Phalaenopsis*.

Recebido em: 13 out. 2019

Aceito em: 28 set. 2020

ABSTRACT

Cloning is a tool used to propagate plant materials, ensuring that the regenerated plants are genetically identical to the desired matrix. It is known that the ornamental plants sector contributes significantly to the economy, and between the most esteemed ornamental plants among Brazilians, there are the orchids. The objective of this study was to establish an efficient asepsis protocol for lateral meristems and to obtain clones of the orchid of the genus *Phalaenopsis*. For the methodology, aiming at the standardization of an asepsis protocol, four treatments were developed and tested with different combinations (concentration × time) of agents such as sodium hypochlorite, alcohol, copper, *tween* and washing of explants. The meristems were removed from the stem of the seedlings, from their floral stems. The obtained results showed that no treatment for asepsis tested here presented significant and positive results. So, it was not possible to establish an asepsis protocol for lateral meristems of orchids of the genus *Phalaenopsis* yet, since all meristems suffered contamination and oxidation. Therefore, it was not yet possible to obtain clones using this methodology. The present work is an initial basis for future research, referring to cloning through meristems in *Phalaenopsis*.

Keywords: cloning; economy; *in vitro* culture; meristems; *Phalaenopsis*.

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Estrada para Boa Esperança, km 4, Zona Rural– CEP 85660-000, Dois Vizinhos, PR, Brasil.

² Autor para correspondência: fernanda_mezzalira25@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais de maior interesse econômico, pois contemplam uma variedade de combinações e formatos de flores (SEBRAE, 2015; PAULIQUEVIS, 2017; BARROS *et al.*, 2018). O gênero *Phalaenopsis* é um dos mais populares e comercializáveis em função de seu custo-benefício, sendo acessível a todas as classes econômicas no Brasil e no mundo (LEE, 2011; COSTA, 2013; SCHOENMAKER, 2017). As orquídeas encontram-se na produção agrária de muitos países, como, por exemplo, de Gorontalo, Indonésia, onde uma das principais fontes de renda da agricultura é a produção de orquídeas (BRITANNICA ACADEMIC, 2017), além de Holanda, Japão, Brasil e outros (SCHOENMAKER, 2017).

O mercado florícola movimentou mais de US\$ 70 bilhões no ano de 2017, e a orquídea do gênero *Phalaenopsis* chegou a ter mais de duas mil plantas comercializadas por semana na Holanda (SCHOENMAKER, 2017). Segundo estimativa de Royal Flora Holland (2018), ainda em 2018, a orquídea do gênero *Phalaenopsis* ocupava a primeira colocação no *ranking* de vendas, com cerca de 139 milhões de plantas.

Para obter plantas com maior qualidade, faz-se uso da biotecnologia, que é muito empregada na propagação de orquídeas, visto sua importância econômica. A biotecnologia consiste em uma ciência que engloba o uso de seres vivos, ou uma parte deles, para desenvolver/obter processos e/ou produtos de interesse econômico e social. Na área das ciências agrárias, é popularmente conhecida como biotecnologia vegetal e empregada para a produção de biofungicidas, bioestimulantes, controle de pragas e doenças, melhoramento genético de plantas, uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, utilização de micorrizas para elevar a produtividade de plantas, transformação genética e outros (FALEIRO & ANDRADE, 2011).

Uma das ferramentas biotecnológicas mais empregadas em plantas ornamentais é a cultura de células e tecidos vegetais, para a micropropagação *in vitro* dos vegetais (ZAHARA *et al.*, 2017). Diversas metodologias para o cultivo *in vitro* da orquídea do gênero *Phalaenopsis* já foram estabelecidas, tais como meio de cultura mais adequado, fotoperíodo, temperatura, germinação, aclimação e outras (MEZZALIRA & KUHN, 2020). Segundo dados da literatura, grande parte dos trabalhos faz uso de sua propagação por sementes, tendo meios e parâmetros de cultivo já definidos e eficientes (ZAHARA *et al.*, 2017; MEZZALIRA & KUHN, 2020), porém a micropropagação via sementes não garante a padronização das plantas, pois ela contribui para aumentar sua diversidade por meio de variações somaclonais, que não podem ser evitadas por esse meio.

Para plantas geneticamente idênticas, uma opção é a clonagem *in vitro*, técnica que possibilita a obtenção de plantas uniformes em características como coloração, tamanho, forma, época de floração etc. (KERBAUY & CHAER, 2011), sendo o cultivo *in vitro* amplamente aplicado em plantas ornamentais também para propagar mudas livres de fitopatógenos (COSTA, 2013).

Na literatura há alguns trabalhos que relatam o uso de clonagem em orquídeas. Assim, pode-se citar, nos últimos anos, a padronização da clonagem da orquídea do gênero *Oncidium* utilizando como segmento suas folhas (MAYER *et al.*, 2011). Ainda, empregaram-se segmentos caulinares para clonagem da orquídea da espécie *Catasetum fimbriatum*, em meio de cultivo Vacin e Went (1949) (COUTINHO NETO & SILVA, 2017). No trabalho de Chaer (2012), estabeleceu-se uma estratégia para clonar *in vitro* orquídeas dos gêneros *Cattleya* e *Cymbidium* com gemas laterais.

Para Soccol (2013), a demanda por clones da orquídea do gênero *Phalaenopsis* é crescente, em função dos consumidores, cada vez mais exigentes em questão de qualidade e características. Entretanto, de acordo com o autor, a grande dificuldade está no estabelecimento *in vitro* do explante, na oxidação dos explantes e na baixa taxa de repicagem. Os problemas encontrados relatam o alto custo de produção de mudas e a dificuldade de clonagem de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*. Técnicas de clonagem por meristemas foram eficazes para outros gêneros de orquídea (CHAER, 2012; SOCCOL, 2013).

Diante da problemática abordada, sabendo da importância econômica e que ainda não se tem um protocolo eficiente nem para a assepsia da orquídea do gênero *Phalaenopsis* nem para a sua clonagem, o presente trabalho teve como objetivo testar o mesmo procedimento de clonagem para a orquídea do gênero *Phalaenopsis sp.*, determinando um protocolo eficiente de assepsia dos meristemas laterais e de obtenção de clones por intermédio de agentes desinfetantes, já utilizados na literatura, e da inoculação dos clones em meio de cultivo acrescido de reguladores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de cultura de células da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos, tendo início em outubro de 2018 e sendo finalizados em julho de 2019.

A metodologia consistiu na clonagem de meristemas laterais (CHAER, 2012; SOCCOL, 2013) da orquídea do gênero *Phalaenopsis* retirados das hastes florais de plantas adultas, testando quatro tratamentos de assepsias, os quais estão descritos a seguir:

- **Tratamento 1:**

1. Lavagem dos meristemas por 20 minutos em água destilada com *tween* (detergente, produto tensoativo que quebra a tensão superficial da água, conferindo maior eficiência à atuação do desinfetante);
 2. Imersão por 10 minutos em álcool 70% com agitação;
 3. Imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 50% com agitação;
- Tríplice lavagem com água destilada estéril.

- **Tratamento 2:**

1. Lavagem dos meristemas por 20 minutos em uma mistura de água destilada com *tween* e cobre 5%;
2. Imersão por 10 minutos no álcool 70% com agitação;
3. Imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 50% com agitação;
4. Tríplice lavagem com água destilada estéril.

- **Tratamento 3:**

1. Lavagem dos meristemas por 20 minutos em uma mistura de água destilada com *tween* e cobre 5%;
2. Imersão por 10 minutos em álcool 70% com agitação;
3. Imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 60% com agitação;
4. Tríplice lavagem com água destilada estéril.

- **Tratamento 4:**

1. Lavagem dos meristemas por 20 minutos em água destilada e *tween*;
2. Imersão por 10 minutos em álcool 70% com agitação;
3. Imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 60% com agitação;
4. Imersão por 10 minutos em solução de cobre 10% com agitação;
5. Tríplice lavagem com água destilada estéril.

Depois dos processos de assepsia, os meristemas foram inoculados nos meios de cultura e permaneceram na sala de cultivo.

Para acompanhar a regeneração dos explantes após a clonagem *in vitro*, estes foram inoculados em 20 tratamentos, que consistiam em combinações variadas de reguladores de crescimento vegetal, sendo eles o ácido naftalenoacético (ANA) (uma auxina) e 6-benzilaminopurina (BAP) (uma citocinina) (KOSIR *et al.*, 2004), acrescidas no meio Knudson (1946). As combinações testadas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Combinações de BAP/ANA em diferentes concentrações para 20 tratamentos utilizados nos testes da clonagem *in vitro* de meristema lateral da orquídea do gênero *Phalaenopsis*.

	ANA (mg)	0	0,5	1	1,5
BAP (mg)	0	T1	T2	T3	T4
	1	T5	T6	T7	T8
	2	T9	T10	T11	T12
	3	T13	T14	T15	T16
	4	T17	T18	T19	T20

BAP: 6-benzilaminopurina; ANA: ácido naftalenoacético.

Fonte: Primária (2020).

Foram utilizados frascos (previamente usados com ampicilina), cada um com 3 mL de meio de cultura, e realizaram-se os tratamentos em triplicata. Os explantes ficaram em sala de cultivo com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 16 horas, por 90 dias. As análises feitas consistiram na observação de contaminação dos explantes após o processo de assepsia e na brotação nos meios de cultura, por intermédio de análise estatística por método de Tukey a 95% de significância, dos 20 tratamentos testados para a clonagem, mediante o programa Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas pelos Métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan (SASM-Agri).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível estabelecer um protocolo de assepsia adequado para os meristemas laterais de orquídeas do gênero *Phalaenopsis* (figura 1), uma vez que todas as inoculações realizadas em meio de cultivo tiveram problemas de contaminação e oxidação. Nesse experimento, foram perdidos 100% dos meristemas (figura 2).



BAP: 6-benzilaminopurina; ANA: ácido naftalenoacético.

Figura 1 – Inoculação *in vitro* de meristemas laterais da orquídea do gênero *Phalaenopsis* em meios de cultivo com combinações de BAP/ANA. Fonte: Primária (2020).

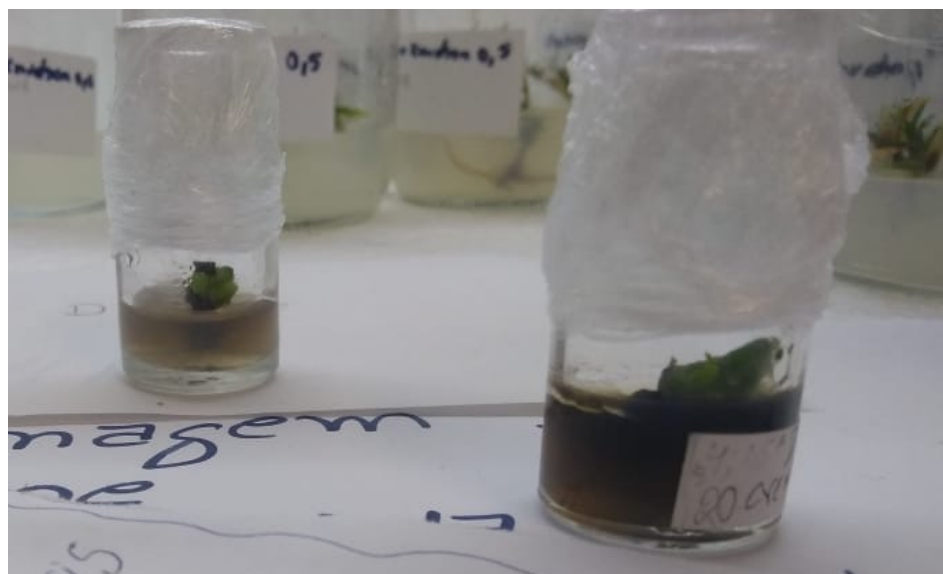


Figura 2 – Contaminação de meristemas laterais da orquídea do gênero *Phalaenopsis*, após testes de assepsia. Fonte: Primária (2020).

A oxidação tem como origem complexos fenólicos, mas o uso de meios de cultivo líquidos pode reduzir o escurecimento do meio. A principal indicação para diminuir a oxidação é o uso de aditivos no meio de cultura, tais como o ácido cítrico ou o ácido ascórbico (SOCCOL, 2013).

Os agentes empregados para a assepsia do material no presente experimento são amplamente utilizados na assepsia de orquídeas de demais gêneros, porém estes últimos com sementes. No trabalho de Chaer (2012), as sementes de *Cattleya* foram desinfetadas com a imersão em hipoclorito de sódio 20% (v/v) por 15 minutos com gotas de detergente *tween*, seguida de tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Para Mezzalira & Kuhn (2018), na germinação de sementes da orquídea do gênero *Phalaenopsis*, a desinfecção ocorreu com hipoclorito de sódio 20% (v/v) por 5 minutos, seguida do uso de álcool 70% por 5 minutos e tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Protocolos eficientes de assepsia de meristemas, preferencialmente de baixo custo e mínima indução de variação somaclonal, são uma necessidade entre os produtores (SOCCOL, 2013). Em função do apelo econômico, os agentes mais empregados são o hipoclorito de sódio e o álcool, pois são de fácil acesso e de baixo custo.

Encontram-se, na literatura, informações referentes à indicação do uso do meio de cultura Vacin e Went (1949) com acréscimo de 150 mL/L de água de coco para a clonagem da orquídea do gênero *Phalaenopsis* (SOCCOL, 2013), entretanto Mezzalira & Kuhn (2020) relatam que o meio de cultura mais recomendado para a orquídea do gênero *Phalaenopsis* é o Knudson acrescido de suco de cenoura 10% (v/v), pois tal meio propicia o melhor desenvolvimento das plantas e reduz os índices de contaminação e oxidação. Drong (2004) cita o uso de meio Knudson para a orquídea do gênero *Phalaenopsis*, e Araújo *et al.* (2006) dizem que muitos autores sugerem o meio Vacin e Went (1949) para os gêneros de orquídea *Cattleya*, *Encyclia* e *Oncidium*.

Quanto aos reguladores de crescimento, estes são muito utilizados em diversos trabalhos, sendo apontado na organogênese da orquídea do gênero *Phalaenopsis* por Takuhara & Mii (1993) e na obtenção de clones de gemas laterais o meio de cultura New Dogashima, com adição de 0,1 mg/L de ANA e 1 mg/L de BAP. Todavia, um trabalho posterior mostrou o uso do meio de cultura New Dogashima especificamente para a regeneração de folhas estilionadas (MINAMIGUCHI & MACHADO NETO, 2007). Para Ulisses *et al.* (2016), cultivando a orquídea do gênero *Phalaenopsis in vitro*, o meio de cultura Murashige e Skoog (1962) alcançou resultados superiores ao meio New Dogashima. Por outro lado, Franceschi (2013) diz que não foi possível obter regeneração de folhas da orquídea do gênero *Phalaenopsis* pelo meio New Dogashima.

Para Kosir *et al.* (2004), a multiplicação da orquídea do gênero *Phalaenopsis* foi obtida com uso de 2 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ANA em meio de cultura MS comercial.

A escolha do explante a ser utilizado também é um fator que interfere no sucesso da clonagem, pois, segundo Chaer (2012), estiolar o caule das hastes de orquídea, de modo a isolar as gemas (meristemas) laterais, causaria alteração hormonal nas auxinas e citocininas, trazendo como benefício o desenvolvimento dessas gemas, já que, quando o meristema lateral é isolado e posteriormente inoculado em presença de luz, o processo de regeneração de uma planta completa é acelerado. Na orquídea do gênero *Cattleya*, a presença do hormônio giberelina no meio de cultivo promoveu a liberação das gemas e seu alongamento (CHAER, 2012). Porém, quando se compararam dois gêneros de orquídeas, *Cattleya* e *Cymbidium*, o uso do etileno mostrou fenótipos distintos entre elas (CHAER, 2012). Desse modo, constata-se que o protocolo eficiente para um gênero não demonstrará necessariamente resultados positivos para outro gênero.

Os meristemas podem levar ao desenvolvimento de todos os órgãos de uma planta, por serem constituídos de grupos de células que mantêm caracteres de tecidos embrionários (LYNDON, 1990).

Em função dos resultados obtidos no presente experimento, sugere-se que mais estudos sejam realizados quanto à assepsia dos meristemas da orquídea do gênero *Phalaenopsis*, para que se possam futuramente obter clones. Sem determinar o processo de assepsia, não foi possível realizar os experimentos da clonagem *in vitro* da orquídea do gênero *Phalaenopsis* de meristemas laterais, nos 20 tratamentos estabelecidos para teste com combinação de BAP/ANA.

Para que a clonagem seja eficiente, faz-se necessário se ater ao tempo de uso dos explantes, à idade e ao tipo de explantes que serão utilizados, além do cuidado com o uso de substâncias que induzam divisões celulares e que, por consequência, podem causar variação somaclonal indesejável

(CHAER, 2012). Assim, é preciso mais estudos e pesquisas quanto à clonagem de orquídeas e, por fim, o desenvolvimento de protocolos eficientes que propiciem informações essenciais sobre os diversos modos passíveis de uso na clonagem.

CONCLUSÕES

Concluiu-se, com o presente trabalho, que ainda são necessários estudos e experimentos para estabelecer protocolos eficientes de assepsia de meristemas laterais para as orquídeas do gênero *Phalaenopsis*. Somente após uma metodologia eficiente e padronizada para uso de segmentos nodais laterais, será possível estabelecer normas e indicar meios adequados para clonagem, sem perdas por contaminação e oxidação dos materiais.

REFERÊNCIAS

- Araújo, G., Pasqual, M., Villa, F. & Carvalho Costa, F. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. *Revista Ceres*. 2006; 53(310): 608-613.
- Barros, F., Hall, C., Paiva Neto, V. B. & Batista, J. A. N. Checklist of the Orchidaceae from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Iheringia - Serie Botânica*. 2018; 73(Supl.): 287-296.
doi: 10.21826/2446-8231201873s287
- Britannica Academic*. Hawaii. *Britannica Academic*; 2017. [Acesso em: 12 maio 2020]. Disponível em: academic-eb-britannica.ez48.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Hawaii/39594.
- Chaer, L. Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.
- Costa, M. Micropropagação de orquídea. Junghans, T. G. & Souza, A. da S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed. Brasília: Embrapa; 2013. p. 373-392.
- Coutinho Neto, A. A. & Silva, P.P.A. Recursos genéticos vegetais: aplicações do cultivo *in vitro*. *Anais do VII Botânica no Inverno*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica; 2017. 332 p. p. 261.
- Dronk, A. G. Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2004.
- Faleiro, F. G. & Andrade, S. R. M. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2011. 730 p.
- Franceschi, C. R. B. Conservação de sementes e micropropagação de orquídeas da mata atlântica utilizando a técnica "thin cell layer" [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2013.
- Kerbaui, G. B. & Chaer, L. Micropropagação comercial de orquídeas: Conquistas, desafios e perspectivas. Gerald, L. T. S. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua; 2011. p. 178-205.
- Knudson, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 1946; 14(2): 214-217.
- Kosir, P., Skof, S. & Luthar, Z. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2004; 83(2): 233-242.
- Lee, L. L. Biofábrica de *Phalaenopsis*. Lee, T. S. G. Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua; 2011. p. 150-175.
- Lyndon, R. F. Plant development: the cellular basis. Cambridge: Cambridge University Press; 1990. 320 p.

- Mayer, J. L. S., Cardoso-Gustavson, P. & Appezzato-da-Glória, B. Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora Elsevier*. 2011; 206(3): 185-190.
doi: 10.1016/j.flora.2010.09.003
- Mezzalira, F. K. & Kuhn, B. C. Cultivo de *Phalaenopsis* híbrida. Anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica. Apucarana; 2018.
- Mezzalira, F. K. & Kuhn, B. C. Uso de ferramentas da bioinformática para determinação dos possíveis efeitos do β -caroteno no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Colloquium Agrariae*. 2020; 16(2): 101-113.
- Minamiguchi, J. Y. & Machado Neto, N. B. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*: Orchidaceae. *Colloquium Agrariae*. 2007; 3(1): 7-13.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pauliquevis, M. Mercado de flores sobrevive à crise. Estado de Minas; 2017. [Acesso em: 25 out. 2019]. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/08/25/internas_economia,895049/mercado-de-flores-sobrevive-a-crise.shtml.
- Royal Flora Holland. Annual Report 2018: Top 5 Kamerplanten. Royal Flora Holland; 2018. [Acesso em: 22 abr. 2019]. Disponível em: http://annualreport.royalfloraholland.com/?_ga=2.32929982.1210685090.153704586-565804113.1537704586#/feiten-en-cijfers/kamerplanten?_k=i558by.
- Schoenmaker, K. Boletim Informativo Ibraflor. 2017. 81 p.
- Sebrae – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Flores e plantas ornamentais do Brasil. Brasília: Sebrae; 2015. v. 1.
- Soccol, J. J. Rosas, orquídeas, hortênsias e campânula – pesquisas e possibilidades de inovação avaliadas em Lages-SC e em Arujá – SP [Relatório de Estágio]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
- Takuhara, K. & Mii, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower atalk buds. *Plant Cell Reports*. 1993; 13: 7-11.
doi: 10.1007/bf00232306
- Ulisses, C., Pereira, J. A. F., Silva, S. S. & Arruda, E. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* classic spotted pink (Orchidaceae). *Acta Biológica Colombiana*. 2016; 21(3): 571-580.
doi: 10.15446/abc.v21n3.50032
- Vacin, E. & Went, F. W. Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette*. 1949; 110: 605-613.
- Zahara, M., Datta, A., Boonkorkaew, P. & Mishra, A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2017; 60: e160149.
doi: 10.1590/1678-4324-2017160149