INDUÇÃO, PROLIFERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESP) DE *SCHOMBURGKIA CRISPA* LINDL. (ORCHIDACEAE)

Paulo Cesar Poeta Fermino Junior¹, Dara Damiana Souza Guanais², Mariana Gabriela de Nadai³

¹Biólogo. Professor. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciências Naturais e Sociais. Curitiba, SC. (paulo.fermino@ufsc.br)

²Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais. Curitiba, SC.

³Bióloga. Laboratório Cultivar Orquídeas in vitro. Arealva, SP.

Recebido em: 15/12/2021 – Aprovado em: 15/12/2021 – Publicado em: 30/12/2021

DOI: 10.18677/Agrarian_Academy_2021B5

trabalho licenciado sob licença [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

RESUMO

A micropropagação de orquídeas por meio da indução de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs) consiste numa importante estratégia de propagação e conservação de germoplasma de espécies nativas brasileiras como *Schomburgkia crispa* Lindl. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de TDZ na indução, proliferação e regeneração de ESPs de *S. crispa*. Protocormos com uma folha foram usados como fonte de explante em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μ M) para a formação de ESPs. Após 90 dias, os clusters de ESPs foram transferidos para meio de regeneração de plantas isento de regulador de crescimento. A indução e regeneração de ESPs de coloração esverdeada ocorrem por via direta com o uso de TDZ. ESPs secundários foram observados. A concentração com o maior número de ESPs formados (6,8) e maior número de plantas regeneradas (4,8) foi de 1,0 μ M de TDZ. Elevadas concentrações de TDZ (4,0 μ M) apresentam efeito inibitório na morfogênese de ESPs. A propagação *in vitro* de *S. crispa* por meio da indução, proliferação e regeneração de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs) a partir de protocormos com baixas concentrações de TDZ consiste num protocolo eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Propagação *in vitro*. Regeneração de brotos. Thidiazuron.

INDUCTION, PROLIFERATION AND REGENERATION OF PROTOCORM-LIKE BODY (PLB) OF *SCHOMBURGKIA CRISPA* LINDL. (ORCHIDACEAE)

ABSTRACT

The micropropagation of orchids through induction of Protocorm-like Bodies (PLBs) is an important strategy for the propagation and conservation of germplasm of native Brazilian species such as *Schomburgkia crispa* Lindl. The objective of the present work was to evaluate the effect of TDZ on the induction, proliferation and regeneration of ESPs from *S. crispa*. One-leaf protocorms were used as an explant source in MS culture medium supplemented with different concentrations of TDZ (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 μ M) for the formation of PLBs. After 90 days, clusters of PLBs

were transferred to growth regulator-free plant regeneration medium. The induction and regeneration of greenish PLBs occurs directly with the use of TDZ. Secondary PLBs were noted. The concentration with the highest number of formed PLBs (6.8) and the highest number of regenerated plantlets (4.8) was 1.0 μM TDZ. High concentrations of TDZ (4.0 μM) have an inhibitory effect on the morphogenesis of PLBs. *In vitro* propagation of *S. crisper* through the induction, proliferation and regeneration of Protocorm-like Bodies (PLBs) from protocorms with low concentrations of TDZ is an efficient protocol.

KEYWORDS: *In vitro* propagation. Shoot regeneration. Thidiazuron.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas amplamente distribuídas por todos os continentes, apresentando maior abundância e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente da Ásia e das Américas (BARBERENA *et al.*, 2019). No Brasil podem ser encontradas cerca de 2.446 espécies, destas 1.568 são endêmicas do país (BARBERENA *et al.*, 2019). Além de sua inquestionável importância botânica e ecológica, as orquídeas participam de sistemas de cultivo atuais usando horticultura de alta tecnologia, cultivadas em ambientes com bom controle do clima, principalmente da temperatura, o que permite a indução do florescimento independente da época do ano, principalmente visando o abastecimento programado de flores em vasos e flores de corte no competitivo mercado mundial de flores (CARDOSO *et al.*, 2020). Dentro da família Orchidaceae destaca-se a espécie *Schomburgkia crispata* Lindl., nativa de florestas de galeria e matas secas do Cerrado brasileiro (BARROS *et al.*, 2018), e que encontra-se na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (CNCFlora, 2017).

Além do potencial ornamental, as orquídeas nativas brasileiras podem ter compostos bioativos com aplicações terapêuticas (SORGATO *et al.*, 2021). Em *S. crispata*, os estudos fitoquímicos indicam a existência de ácido crispóico, no qual tem potencial anticarcinogênico (BELLOTO *et al.*, 2017).

A propagação de orquídeas em condições naturais é dificultada devido à falta de endosperma e tamanho diminuto das sementes (ARDITTI, 2008). A propagação *in vitro* partindo do uso de sementes tem sido utilizada para a propagação de orquídeas e é considerada fundamental para a conservação da variabilidade genética, com elevada porcentagem de germinação, sem a relação simbiótica com fungos (FAY, 2018).

As Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs) são propágulos *in vitro* originados da indução, proliferação e regeneração de diferentes tipos de explantes somáticos em cultura de tecidos vegetais, considerado um tipo de propagação vegetativa (CARDOSO *et al.*, 2020). A micropropagação de orquídeas utilizando a formação das ESPs possibilitou a industrialização nos laboratórios comerciais (CHUGH *et al.*, 2009), aumentando a escala de produtividade. A produção de ESPs pode ser comparada a um tipo de embriogênese somática que ocorre em orquídeas, com anatomia, histogênese e características celulares similares a formação dos protocormos (LEE *et al.*, 2013).

Alguns dos fatores influentes na indução de ESPs que tem sido amplamente avaliados são a concentração e possíveis combinações de reguladores de crescimento de plantas. Resultados de outros trabalhos indicam que a formação de ESPs parece ser influenciada principalmente pela citocinina BA (6-benziladenina) e

o composto TDZ, semelhante à citocinina (thidiazuron) e, em alguns casos, a combinação dessas citocininas com uma auxina (ZANELLO; CARDOSO, 2019).

Vários explantes têm sido empregados, como os próprios ESPs regenerados (ASA; KAVIANI, 2020), os protocormos (ROMERO *et al.*, 2018), segmentos de folhas (CHOOKOH *et al.*, 2019), e meristemas apicais (SUNITIBALA; NEELASHREE, 2018). Informações sobre a propagação *in vitro* com o uso da indução e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos em *Schomburgkia crispa* não existem.

O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) na indução, proliferação, e regeneração de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs) de *Schomburgkia crispa* Lindl. como estratégia para a micropropagação.

MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas maduras de *Schomburgkia crispa* Lindl. foram coletadas no orquidário da empresa de biotecnologia “Cultivar Orquídeas *in vitro*”, localizada em Arealva-SP e doadas para o estudo. No Laboratório, as cápsulas foram desinfetadas por 2 min em solução de etanol 70%, seguida por 15 min em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo), e finalmente por tríplice lavagem em água destilada esterilizada em câmara de fluxo laminar.

Após a desinfecção, as cápsulas foram excisadas, as sementes foram removidas manualmente com auxílio de pinça e inoculadas em meio de cultura com sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962 – Sigma-Aldrich®), sem regulador de crescimento vegetal, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de Agar Vetec® para a germinação *in vitro*.

Aos sessenta dias, os protocormos desenvolvidos com a primeira folha (Figura 1), conforme classificação de Stewart e Zettler (2002) foram inoculados em meio de cultivo para indução, proliferação e regeneração de estruturas semelhantes a protocormos (IPR-ESPs) composto por sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962 – Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de Agar Vetec® e diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) a 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 µM. Aos noventa dias de cultivo, os parâmetros fitotécnicos avaliados foram o percentual de formação de ESPs, e número de ESPs regenerados por explante.

As ESPs regeneradas conglomeradas (clusters) foram transferidas para meio de regeneração de plantas (microbrotos), composto pelos sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962 – Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de Agar Vetec®, isento de regulador de crescimento vegetal. Após noventa dias de cultivo em meio de regeneração foram analisados o percentual de conversão de plantas e o número de plantas regeneradas por explante.

Os cultivos *in vitro* foram realizados em frascos de vidro transparente contendo 20 mL de meio de cultivo e fechados com tampa convencional. Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20min a 1,06 kg cm⁻². Os frascos de cultura foram incubados em sala de crescimento a 25 ±2 °C, 16 h de luz e 8h de escuro, com lâmpadas brancas fluorescentes de fluxo de fótons de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

O experimento de indução foi organizado em delineamento completamente casualizado, com seis repetições para cada tratamento, sendo cada unidade amostral composta por um frasco contendo vinte protocormos. Os resultados foram submetidos análise da variância (ANOVA) com aplicação do teste F e as médias,

quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o software estatístico SISVAR 5.6. As variáveis discretas, provenientes de contagem (número), foram transformadas na $(x+0,5)$, onde x é o percentual obtido de cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocormos de *Schomburgkia crispa* Lindl. com uma folha (Figura 1) expressaram resposta morfogênica de indução, proliferação e regeneração de estruturas globulares esverdeadas na presença de thidiazuron (TDZ), denominadas de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs). Os ESPs surgiram por rota morfogênica direta, isto é, sem a formação de calo. Resultados semelhantes de indução e formação de ESPs com o uso de TDZ por via direta também foram registradas em *Coppensia ranifera* utilizando-se protocormos como fonte de explante (FERMINO JR. *et al.*, 2018). O uso de TDZ em protocolos de indução e regeneração de ESPs tem sido um eficiente regulador de crescimento (ROMERO *et al.*, 2018).

A ausência de TDZ não possibilitou formação de ESPs. Em cada explante utilizado formaram-se conglomerados (clusters) de ESPs (Figura 2), e em seguida, novos microbrotos foram regenerados (Figuras 3 e 4) após a transferência para meio de cultura de regeneração. A controvérsia existente entre a natureza de a rota morfogênica ser de origem organogênica ou embriogênica embasou nossa nomenclatura utilizada proposta por Cardoso *et al.* (2020) como indução, proliferação e regeneração de ESPs, denominada de IPR-ESP.

FIGURAS 1-4. Morfogênese *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. sob diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ). 1. Protocormos germinados *in vitro* com uma folha. 2. Conglomerados (clusters) de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) com ESPs secundários (seta). 3. Regeneração de microbrotos (seta) a partir de ESPs. 4. Microbroto regenerado com formação de raízes adventícias (seta). Barras= 3 mm (1), 5 mm (2,3,4).

Fonte: os autores (2021)

O mais alto percentual de formação de ESPs (92 %) ocorreu com o uso de 1,0 µM de TDZ. A análise de regressão dos resultados indicou um ajuste ao modelo quadrático com coeficiente de determinação de 0,71, sendo os maiores percentuais de formação dos ESPs com concentrações entre 1,0 e 2,0 µM, e efeito inibitório em concentrações acima de 2,0 µM (Figura 5). Respostas morfogênicas semelhantes no percentual de formação de ESPs a partir de protocormos de *C. ranifera* foram descritas por Fermino Jr. *et al.* (2018), sendo as baixas concentrações de TDZ com efeito indutor e as altas concentrações com efeito inibidor. Desenvolvimento de ESPs secundários foram observados nos explantes (Figura 2), ou seja, organização de novos ESPs a partir dos ESPs já formados inicialmente. Esse padrão morfogênico também foi registrado em *Oncidium* sp. a partir de indução em folhas (CHOOKOH *et al.*, 2019).

FIGURAS 5-8. Respostas fisiológicas na morfogênese *in vitro* de *Schomburgkia crista* Lindl. sob diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). 5. Percentual de formação de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs). 6. Número de ESPs regenerados por explante. 7. Percentual de conversão de Plantas. 8. Número de Plantas regeneradas por explante.

Fonte: os autores (2021)

A maior quantidade de ESPs regenerados por explante ocorreu com o uso de 1,0 µM de TDZ (Figura 6), e a menor quantidade com o uso de 0,5 µM de TDZ. Concentrações acima de 2,0 µM exibem tendência de inibição no número de ESPs

regenerados, modelo expresso pela equação de regressão quadrática com coeficiente de terminação (r^2) de 0,59. Resultados diferentes no maior número de ESPs regenerados a partir de protocormos foram observados em *Chloraea gaviu* Lindl. onde o uso de baixas concentrações de TDZ (0,45 μ M) foram mais eficientes (ROMERO *et al.*, 2018). Nesse sentido, as respostas de morfogênese *in vitro* com uso de diferentes concentrações de reguladores de crescimento são dependentes da espécie.

Em meio de regeneração de plantas, as ESPs tiveram os maiores percentuais de conversão em plantas (microbrotos) com o uso de 0,5 e 2,0 μ M de TDZ (85 e 82,3%, respectivamente), sendo os menores percentuais com o uso de 1,0 e 4,0 μ M de TDZ (Figura 7). No estudo da conversão de ESPs em plantas de *C. ranifera* os maiores valores (56,8%) foram registrados com o uso de 1,0 μ M de TDZ (FERMINO JR. *et al.*, 2018). Elevados percentuais de regeneração de plantas a partir de ESPs também foram observados em estudo com *Phalaenopsis belina*, com valores entre 99 e 100% (CHEW *et al.*, 2018). Os microbrotos (plantas) regenerados de *S. crispa* apresentavam início de crescimento de raízes adventícias (Figura 4). A formação de raízes adventícias em meio de cultura isento de regulador de crescimento também foi observado na regeneração de plantas a partir de ESPs de *Phalaenopsis amabilis* (L.) (ASA; KAVIANI, 2020).

O número de plantas regeneradas por explante foi maior (4,8 plantas) com o uso de 1,0 μ M de TDZ (Figura 8), e os menores valores com as demais concentrações de TDZ utilizadas nesse experimento. No estudo com *Phalaenopsis amabilis* o melhor tratamento utilizado (1,0 mg L⁻¹ Kin + 1,0 mg L⁻¹ IBA) possibilitou a regeneração de até 30,4 plantas (ASA; KAVIANI, 2020), valores sete vezes maiores do que os obtidos no presente estudo. O uso de diferentes citocininas combinadas ou não com auxinas podem aumentar as taxas de propagação *in vitro* de *S. crispa* por meio da indução, proliferação e regeneração de ESPs. Esse trabalho é o primeiro registro de micropropagação de *S. crispa* através da indução de ESPs.

CONCLUSÃO

A propagação *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. por meio da indução, proliferação e regeneração de Estruturas Semelhantes a Protocormos (ESPs) a partir de protocormos é viável com o uso de Thidiazuron (TDZ). A concentração com o maior número de ESPs formados (6,8) e maior número de plantas regeneradas (4,8) recomendada nesse estudo é de 1,0 μ M de TDZ. Elevadas concentrações de TDZ (4,0 μ M) apresentam efeito inibitório na morfogênese de ESPs.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids**. Vol 1. Blackwell Publishing, 2008. 1547 p.
- ASA, M.; KAVIANI, B. *In vitro* propagation of orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. Jawa. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 10, n. 2, p. 3113-3123. 2020.
- BARBERENA, F.F.V.A.; SOUSA, T.S.; ROCHA JUNIOR, J.A.L. Mapping threats to the orchid populations in an environmental protection area in Bahia Northeast Brazil.

Oecologia australis, v.23, p.346-356, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4257/oeco.2019.2302.12>

BARROS, F.; HALL, C.F.; PAIVA NETO, V.B.; BATISTA, J.A.N. Check-list das Orchidaceae do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v.73, supl., p.287-296, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21826/2446-8231201873s287>

BELLOTO, C. A.; SOUZA, G. K.; PERIN, P. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; *et al.*; Crispoic acid, a new compound from *Laelia marginata* (Orchidaceae), and biological evaluations against parasites, human câncer cell lines and Zika virus. **Natural Product Research**, v.31, p.1-6, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1395428>

CARDOSO, J.C.; ZANELLO, C.A.; CHEN, J.T. An overview of Orchid Protocorm-Like Bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.985, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21030985>

CHEW, Y.C.; HALIM, M.H.A.H.; ABDULLAH, M.A.N.W.; ABDULLAH, J.O.; LAI, K.S. Highly efficient proliferation and regeneration of Protocorms-like Bodies (PLBs) of threatened orchid, *Phalaenopsis bellina*. **Sains Malaysiana**, v. 47, n. 6, p. 1093-1099, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4706-03>

CHOOKOH, N.; CHIU, Y.T.; CHANG, C. Micropropagation of *Tolumnia* Orchids through Induction of Protocorm-like Bodies from leaf segments. **HortScience**, v. 54, n.7, p. 1230-1236, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13747-18>

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>

CNCFlora. **Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha**. 2017. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>. Acesso em 15 out. 2021.

FAY, M. F. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, v.59, p.1-6, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40529-018-0232-z>

FERMINO JR., P.C.P.; DILL, L.; DAL VESCO, L.L.; GUNTHER, K. Propagação *in vitro* de *Coppensia ranifera* (Lindl.) F. Barros & V.T. Rodrigues (Orchidaceae). **Revista Agrotecnologia**, v.9, n.2, p.9-17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12971/2179-5959/agrotecnologia.v9n2p9-17>

LEE, Y.; HSU, S.; YENG, E. C. Orchid protocorm like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, v.100, n.11, p.2121-2131, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/ajb.1300193>

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

ROMERO, C.; CUBA-DIAZ, M.; SILVA, R. *In vitro* culture of *Chloraea gaviola* Lindl., an endemic terrestrial orchid from Chile. **Plant Biosystems**. v. 152, n. 4, p. 612-620, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1306001>>

SORGATO, J.C.; MUDOLON, E.D.; GUIMARÃES, F.F.; SOARES, J.S.; RIBEIRO, L.M. Light sources on the germination and initial *in vitro* establishment of *Schomburgkia crispa* Lindl., a species of the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v.51, n.3, e20190022, 2021. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190022>>

STEWART, S.L.; ZETTLER, L.W. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habena riarepens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. **Aquatic Botany**, v.72, n.1, p.25-35, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00214-5)>

SUNITIBALA, D.; NEELASHREE, N. Micropropagation of monopodial orchid, *Rhynchostylis retusa* (L.). **International Journal of Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 181-186, 2018.

ZANELLO, C.A.; CARDOSO, J.C. PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis*. **The Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology**, v.94, p.627-631, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1600384>>