

## Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum* submetidos a tratamento com ácido peracético e colchicina

Lilian Keiko Unemoto, Ricardo Tadeu de Faria\*, Deonísio Destro, Cristiane Muniz Barbosa e Alessandro Borini Lone

Programa de Pós-graduação em Agronomia, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: faria@uel.br

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do ácido peracético e da colchicina na diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum*. O ácido peracético foi testado previamente nas concentrações de 0, 3, 6 e 9 mL L<sup>-1</sup>, durante dez dias, para verificar a eficácia na esterilização do meio de cultura e os possíveis efeitos fitotóxicos nos protocormos. Após determinação da concentração, foram adicionados 6 mL L<sup>-1</sup> de ácido peracético em meio MS com 0,05% de colchicina e DMSO 1%. Os protocormos foram mantidos em agitação pelos períodos: 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. O experimento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, dez repetições e cinco protocormos por repetição. Após 30 dias, foi avaliada a sobrevivência dos protocormos e, após 180 dias, foram avaliados: número de brotos, altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa fresca das plântulas regeneradas. Os dados foram submetidos à análise de regressão. A concentração de 6 mL L<sup>-1</sup> de ácido peracético a 0,25% pode ser utilizada em substituição ao processo de filtração da solução de colchicina. O aumento do tempo de exposição à colchicina causou aumento no número de protocormos mortos.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, poliploidia, fitotoxicidade, esterilização.

**ABSTRACT.** **Survival and differentiation of *Oncidium flexuosum* protocorm submitted to peracetic acid and colchicine treatment.** The objective of this work was to evaluate the effect of colchicine, when applied at different times on *O. flexuosum* protocorm differentiation. Peracetic acid was previously tested at 0, 3, 6 and 9 mL L<sup>-1</sup> concentrations for 10 days, in order to verify the efficacy on the culture medium sterilization and the possible phytotoxic effects on protocorms. After determining the concentration, 6 mL L<sup>-1</sup> of peracetic acid were added in MS medium with 0.05% colchicine and DMSO 1%. The protocorms were agitated during 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The experimental delineation used was the completely randomized blocks, with 6 treatments, 10 repetitions and 5 protocorms per repetition. Thirty days after the treatment began, protocorm survival rates were assessed; after 180 days, the following were assessed: number of buds, aerial part height, number of roots, the length of the largest root and plantlet fresh mass. The data were submitted to regression analysis. Peracetic acid in the concentration of 6 mL L<sup>-1</sup> can be used as a substitute for the colchicine solution filtration process. The increase in colchicine exposure time caused a rise in the number of dead protocorms.

**Key words:** Orchidaceae, polyploidy, phytotoxicity, sterilization.

### Introdução

Na flora brasileira ocorrem inúmeras espécies de orquídeas com potencial ornamental, como as plantas do gênero *Oncidium*, que é considerado um dos maiores dentro da família Orchidaceae. Neste gênero, existem catalogadas mais de 750 espécies cuja distribuição está limitada às Américas, e a grande maioria ocorre na América do Sul (SUTTLEWORTH et al., 1994).

Segundo Wittmann e Dall'Agnol (2001), a poliploidia, ou seja, a existência de mais de dois

genomas no mesmo núcleo, é ocorrência comum nas plantas, tendo desempenhado importante papel na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas. Estima-se que 95% das pteridófitas e, aproximadamente, 70% das espécies de angiospermas possuem números cromossômicos que são múltiplos do número básico diplóide encontrado em seu gênero (LEITCH; BENNETT, 1997; MONDIN; DOCHA NETO, 2006).

A substância tradicionalmente empregada na indução de poliploidia em plantas é a colchicina (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N) (DOLEZEL et al., 1994). Trata-se de

um alcalóide, extraído a partir de *Colchicum autumnale* (Liliaceae), que age estritamente sobre células em divisão, inibindo o fuso acromático de modo que os cromossomos são paralisados na metáfase, o que conduz a célula a endomitoses sucessivas e ocasional, assim, o aumento de seu nível de ploidia (JENSEN, 1974). A colchicina como agente indutor de poliploidia em cultura de plantas *in vitro* tem suas limitações, pois, em elevadas concentrações ou tratamentos muito prolongados, torna-se tóxica para os tecidos vegetais (HAMILL et al., 1992). Sendo assim, para cada espécie e tipo de material a ser tratado, deve ser determinada a concentração apropriada do alcalóide.

A esterilização é um importante fator no processo de indução de poliploidia. Comumente, o meio de cultura é esterilizado por meio de autoclavagem e a substância antimetabólica, como no caso da colchicina, é adicionada posteriormente por meio de filtração (SILVA et al., 2000; LATADO et al., 2007). A esterilização química é relatada pelo uso de substâncias como o hipoclorito de sódio (YANAGAWA et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2005). O ácido peracético é um microbiocida eficaz, que vêm sendo utilizado na medicina para esterilização e desinfestação de artigos termossensíveis como aparelhos para hemodiálise e endoscópios. Além de ser um material não-tóxico e não-alergênico, pode ser utilizado em baixas concentrações e se decompõe em água, ácido acético e oxigênio, que são produtos biocompatíveis presentes na natureza (FRACARO et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ácido peracético como agente químico esterilizante e da colchicina na diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum*.

## Material e métodos

Foram utilizados protocormos de *Oncidium flexuosum* obtidos a partir de sementes. Para o pré-teste com as diferentes concentrações de ácido peracético, foi utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para o processo de esterilização dos meios de cultura, utilizou-se o ácido peracético (0,25%) nas concentrações de 0, 3, 6 e 9 mL L<sup>-1</sup>; em seguida, o pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,1. Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio com capacidade de 40 mL, e cada tubo continha 10 mL de meio. Os tubos foram previamente lavados e mantidos imersos, por 30 min., em solução de 20 mL L<sup>-1</sup> de ácido peracético.

Para cada concentração, foram feitas dez repetições, sendo cada repetição composta de um tubo contendo dez protocormos. Os tubos com os protocormos foram mantidos em agitação de 100 rpm, em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2°C, fotoperíodo de 16/8h luz escuro<sup>-1</sup> e 2.000 lux de luminosidade pelo período de dez dias. Durante este período, foram avaliados a contaminação e os possíveis efeitos fitotóxicos.

Após a fase dos pré-testes com o ácido peracético, iniciou-se a fase de indução de poliploidia. Foi utilizado o meio MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; em seguida, adicionou-se colchicina 0,05% e DMSO (dimetilsulfóxido) 1%. Em substituição ao processo de autoclavagem dos meios e da filtração da solução de colchicina, foram adicionados 6 mL L<sup>-1</sup> de ácido peracético (0,25%). Os protocormos foram transferidos para tubos de ensaio que continham 30 mL de meio e mantidos em agitação (100 rpm). Em seguida foram acondicionados sob as mesmas condições de fotoperíodo, luminosidade e temperatura citadas anteriormente. Os protocormos foram mantidos em solução de colchicina pelos seguintes períodos de tratamento: 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

Após os respectivos períodos de tratamento com colchicina, os protocormos passaram por tripla lavagem em água destilada e autoclavada e, em seguida, foram transferidos para meio de cultura MS suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (1,0 g L<sup>-1</sup>), para a fase de desenvolvimento dos protocormos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo cinco protocormos.

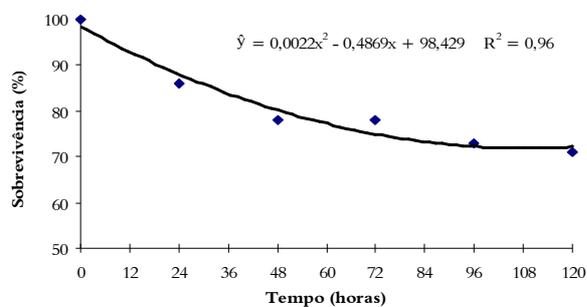
Após 30 dias do início de cada tratamento, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência dos protocormos nos diferentes tratamentos. Passados 180 dias, foram avaliados: número de brotos formados, altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa fresca das plântulas regeneradas. Os dados foram submetidos à análise de regressão.

## Resultados e discussão

Para os pré-testes com ácido peracético, foi observado 100% de contaminação nos meios de cultura sem a presença de ácido peracético. A concentração de 3 mL L<sup>-1</sup> foi insuficiente para a esterilização do meio de cultura, apresentando, ao terceiro dia, contaminação por fungos em um dos tubos e, ao décimo dia, 80% dos tubos apresentavam contaminação. Os meios de cultura cuja concentração de ácido peracético era de 6

mL L<sup>-1</sup> não apresentaram contaminação, e os protocormos se mantiveram sadios. Os meios com concentração de 9 mL L<sup>-1</sup> não apresentaram contaminação dos meios de cultura, no entanto, apresentavam acentuados sintomas de oxidação, não sendo, assim, adequados para o desenvolvimento dos protocormos. Comumente, em procedimentos de indução de poliploidia de plantas, após os meios de cultura serem autoclavados, a colchicina é adicionada por meio de filtros de esterilização em câmara de fluxo laminar, como descrito por Silva et al. (2000) e Latado et al. (2007). O ácido peracético demonstrou ser eficaz no processo de esterilização, simplificando o procedimento para a indução de poliploidia em orquídeas, em relação ao processo de filtração.

Após a determinação da concentração de ácido peracético a ser utilizada no tratamento dos protocormos, avaliou-se o desenvolvimento dos protocormos nos diferentes períodos de tratamento com a colchicina. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada após 30 dias do início do experimento. Os protocormos que não foram tratados com colchicina apresentaram 100% de sobrevivência. Com 24h de tratamento, foram obtidos 86% de sobrevivência, 78% para os períodos de 48 e 72h e 73 e 71% para os períodos de 96 e 120h de exposição à colchicina, respectivamente, ou seja, houve diminuição da porcentagem de sobrevivência em relação ao aumento do tempo de exposição à colchicina (Figura 1).



**Figura 1.** Sobrevivência dos protocormos de *Oncidium flexuosum* em relação aos diferentes tempos de exposição à colchicina, após 30 dias.

Vários autores (BINSFELD et al., 2000; KOUTOLIS et al., 2005; POUTARAUD; GIRARDIN, 2005) relataram o efeito diferencial de antimetabólitos, quando aplicados em diferentes tecidos-alvo por diferentes períodos de exposição. Thao et al. (2003), relatam que a sobrevivência dos explantes após tratamento com colchicina depende da concentração e duração do tratamento, mas em geral, altas concentrações e longos períodos de exposição aos agentes indutores reduzem a sobrevivência das plântulas. Eeckhaut et al. (2002), testaram diferentes

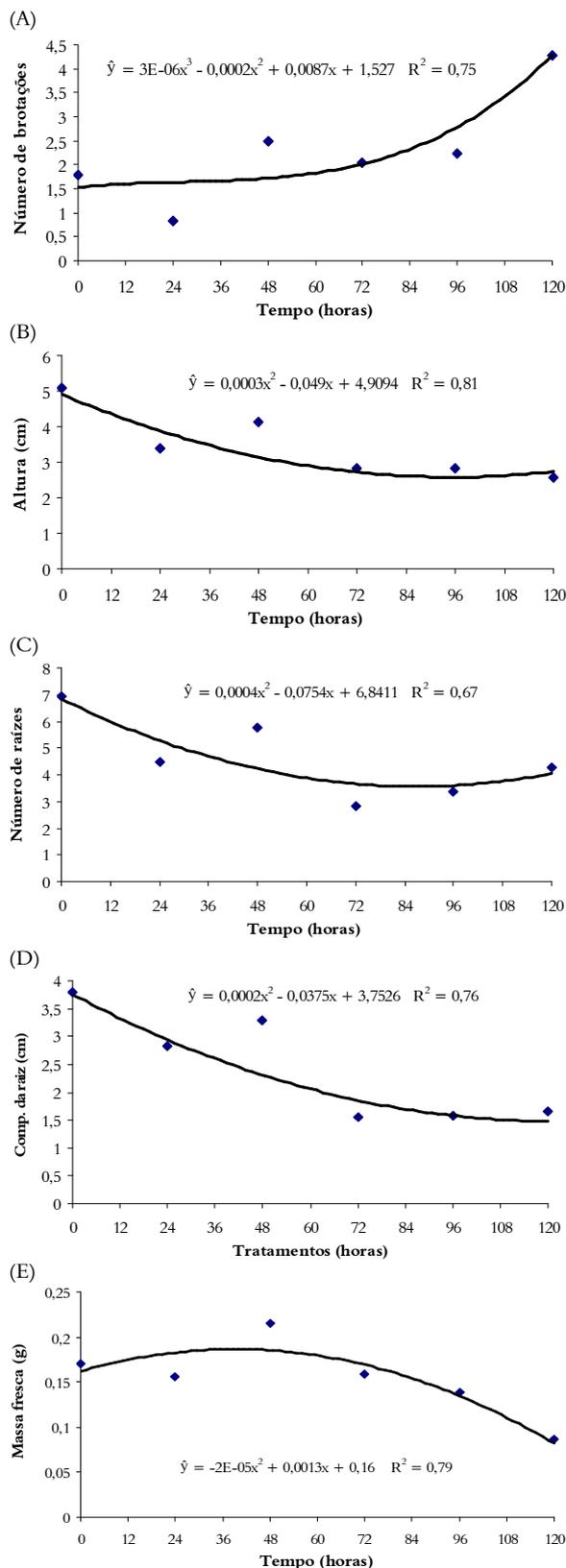
concentrações de colchicina, trifluralina e orizalina para induzir poliploidia em híbridos de *Rhododendron simsii* e obtiveram menor porcentagem de mortalidade no tratamento com colchicina a 0,05%. Thao et al. (2003) cita no entanto que, dependendo da espécie, a colchicina pode apresentar maior efeito fitotóxico que outras substâncias antimetabólicas como esterilidade, crescimento e morfologia anormal, perdas ou rearranjo de cromossomos.

Silva et al. (2000), testando diferentes concentrações de colchicina por quatro e oito dias, obtiveram uma variação entre 0 a 44% e 0 a 33% de protocormos mortos em diferentes clones de *Cattleya intermedia* (Orchidaceae). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações e os tempos de exposição entre os dois clones testados.

Pelas análises de regressão, foi possível notar a tendência do aumento no número de brotações com o aumento do tempo de exposição à colchicina (Figura 2A). O tratamento com colchicina por 120h proporcionou maior número de plantas com brotações, e os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. Os protocormos tratados com colchicina por 120h, além de apresentarem intensa proliferação de brotos, também apresentavam baixo desenvolvimento de parte aérea. Webster e Davidson (1969) e Silva et al. (2000) relatam que a colchicina pode ter efeito similar aos efeitos da citocinina proporcionando crescimento vigoroso e intensificação na coloração das plantas, além da proliferação intensa de brotos, característica esta citada por Tornero et al. (2000) como típico efeito da citocinina, quando utilizada em meios de cultura.

Zaki e Dickson (1995) citam a colchicina como substância capaz de aumentar o número de divisões e embriões formados, além de promover androgênese em cultura de anteras e micrósporos em *Brassica napus*. Segundo Ruiz e Vasquez (1982), a colchicina adicionada ao meio de cultura modifica a relação auxina/citocinina, aumentando a quantidade de células.

Para a altura da parte aérea, verificou-se que as plantas que não foram expostas à ação da colchicina apresentaram médias superiores, quando comparadas às plantas que foram expostas ao tratamento com o alcalóide (Figura 2B). Quanto maior o período de exposição à colchicina, menor crescimento em altura das plântulas. Ahloowalia (1967), em estudos para indução de poliploidia em *Lolium perenne*, observou retardo no crescimento das plantas tratadas, além de modificações na morfologia, como intensificação da coloração verde e aumento na espessura da primeira folha emergente.



**Figura 2.** Influência dos diferentes tempos de exposição à colchicina para as variáveis: número de brotos (A), altura (B), número de raízes (C), comprimento de raiz (D) e massa fresca (E) em *Oncidium flexuosum*, após 180 dias.

Vainõlã (2000) observou em *Rhododendron* que os brotos que passaram por tratamento com colchicina ou orizalina emergiram mais lentamente que os brotos não tratados. Singh (1986), em estudos com *Arachis hypogaea* L., também observou retardo no crescimento das plantas tratadas com colchicina.

O número de raízes formadas igualmente apresentou declínio com o aumento do tempo de exposição à colchicina (Figura 2C). As plantas que sofreram exposição ao alcalóide desenvolveram menor número de raízes que as plantas não-tratadas, exceção apenas para o tempo de 48h, em que o número de raízes não apresentou acentuada diferença em relação às plantas que não foram expostas ao tratamento com colchicina.

Para o comprimento de raízes, as plantas que não passaram por tratamento com colchicina foram as que apresentaram as maiores raízes (Figura 2D). As plantas tratadas pelos períodos de 72, 96 e 120h foram as que apresentaram as menores médias de comprimento de raízes, demonstrando ter seu desenvolvimento afetado com o aumento do tempo de exposição à colchicina.

As plantas que passaram por tratamento de 48h em colchicina foram as que apresentaram maior média em massa fresca, quando comparadas à testemunha e aos tratamentos de 24, 72, 96 e 120h (Figura 2E). O tratamento de 120h foi o que apresentou menor média de massa, uma vez que neste tratamento ocorria apenas a intensa proliferação de brotos e baixo desenvolvimento vegetativo.

Verificou-se redução no crescimento da parte área e de raiz com o aumento do tempo de exposição à colchicina. Para a variável massa fresca, também houve diminuição da média com o aumento do tempo de exposição após 36h de tratamento. Esses resultados demonstram que o tempo de exposição à colchicina é um importante fator que interfere tanto no desenvolvimento vegetativo quanto na sobrevivência das plantas. De acordo com Thao et al. (2003), o retardo no crescimento e a proliferação dos brotos tratados estão ligados à penetração da colchicina nas células meristemáticas, afetando a divisão normal das células.

Com exceção ao número de brotações, foi observada diminuição das médias em relação ao aumento do período de exposição à colchicina, porém o tratamento de 48h foi o que apresentou médias acima do valor esperado para todas as características avaliadas, exceto número de brotações. A concentração de 0,05% de colchicina é uma concentração utilizada por vários autores

(GANDHI; PATIL, 1997; THAO et al., 2003; BARBOSA et al., 2007), porém com períodos de exposição variáveis de acordo com a espécie e o tipo de explante utilizado.

### Conclusão

O ácido peracético na concentração de 6 mL L<sup>-1</sup> pode ser utilizado para esterilização em substituição ao processo de filtração da solução de colchicina. O aumento do tempo de exposição à colchicina causou aumento no número de protocormos mortos, bem como menor desenvolvimento de parte aérea e raiz em plântulas de *Oncidium flexuosum*.

### Referências

- AHLOOWALIA, B. S. Colchicine induced polyploids in ryegrass. **Euphytica**, v. 16, n. 2, p. 49-60, 1967.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim- elefante e milho. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 365-372, 2007.
- BINSFELD, P. C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 263-272, 2000.
- DOLEZEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, Y. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 275-309, 1994.
- EECKHAUT, T.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E. *In vitro* polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. **Acta Horticulture**, v. 572, n. 1, p. 43-49, 2002.
- FRACARO, G. B.; JUCHEM, C.; CORREA, A. M.; SAMUEL, S. M. W. A influência da imersão em ácido peracético sobre a reprodução de detalhes e compatibilidade dos elastômeros com gesso. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 55, p. 61-65, 2007.
- GANDHI, S.; PATIL, V. P. Colchicine induced autotetraploidy in *Clitoria ternatea* L. **Cytologia**, v. 62, n. 1, p. 13-17, 1997.
- HAMILL, S. D.; SMITH, M. K.; DODD, W. A. *In vitro* induction of banana autotetraploid by colchicine treatment of micropropagated diploids. **Australian Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 887-896, 1992.
- JENSEN, C. J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: JENSEN, C. J. (Ed.). **Haploids in higher plants: advances and potentials**. Guelph: University of Guelph, 1974. p. 153-192.
- KOUTOLIS, A.; ROY, A. T.; PRICE, A.; SHERRIFF, L.; LEGGETT, G. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 105, n. 2, p. 263-268, 2005.
- LATADO, R. R.; YALY, M. C.; CARVALHO, C. R.; MACHADO, M. A. Plantas autotetraploides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1429-1435, 2007.
- LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.
- MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família Orchidaceae. **Orchidistudium**, v. 1, n. 4, p. 24-54, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962.
- POUTARAUD, A.; GIRARDIN, P. Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, n. 2, p. 101-108, 2005.
- RUIZ, M. L.; VASQUEZ, A. M. Colchicine effect on the chromosome number of barley embryos cultured *in vitro*. **Protoplasma**, v. 113, n. 3, p. 237-240, 1982.
- SILVA, P. A. K. X. M.; JACQUES, S. C.; ZANETTINI, M. H. B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2000.
- SINGH, A. K. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. 7. Autotetraploid production and prospects in interspecific breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 164-169, 1986.
- SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994.
- THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 1, p. 19-25, 2003.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Chemical sterilization of culture medium: 2. addition of sodium hypochlorite to the medium. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 591, 2005.
- TORNERO, O. P.; LOPEZ, J. M.; EGEE, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, n. 3, p. 283-286, 2000.
- VÄINÖLÄ, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. **Euphytica**, v. 112, n. 3, p. 239-244, 2000.
- WEBSTER, P. L.; DAVIDSON, D. Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3yl-acetic in *Vicia faba* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 20, n. 64, p. 671-683, 1969.
- WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 169-175, 2001.

YANAGAWA, T.; NAGAI, M.; OGINO, T.; MAEGUCHI, R. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. **Lyndleyana**, v. 10, n. 1, p. 33-36, 1995.

ZAKI, M. A. M.; DICKNISON, H. G. Modification of cell development in vitro: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, n. 3, p. 255- 270, 1995.

*Received on January 9, 2008.*

*Accepted on May 2, 2008.*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.