

11. Produtos Naturais Bioativos e suas Aplicações

**Efeito do extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no cultivo *in vitro* de
Epidendrum secundum Jacq.**

Amatuzi, Julio César de Araujo; Hayashi, Leila; Neves, Filipe Augusto da Silva; Vieira, Leila do Nascimento; Fraga, Hugo Pacheco de Freitas; julio.amatuzi@gmail.com;

leilavieira@ufpr.br; hugofraga@ufpr.br

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Resumo

Orquídeas são plantas da família Orchidaceae, que compreende diversas espécies epífitas, rupícolas e terrícolas, muitas ameaçadas de extinção. Essas espécies apresentam baixas taxas de germinação na natureza devido à ausência de reservas nutritivas na semente, sendo a propagação *in vitro* uma alternativa aplicável para otimizar o processo germinativo e a posterior formação de plântulas. Assim, o presente trabalho buscou otimizar as condições de cultivo *in vitro* de plântulas de *Epidendrum secundum* através da suplementação com diferentes concentrações de extrato obtido a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii*. Sementes de *E. secundum* foram germinadas *in vitro* e as plântulas obtidas foram cultivadas em meio de cultura MS, com a concentração de sais reduzido pela metade (MS/2), suplementado com 3% de sacarose e diferentes concentrações do extrato: 0, 6, 12, 25, 50, 100 mg L⁻¹. Como resultados do cultivo *in vitro*, observou-se que a presença do extrato de *K. alvarezii* estimulou de forma crescente o desenvolvimento das plântulas, proporcionalmente ao aumento da concentração, exceto na maior concentração testada (100 mg L⁻¹), onde demonstrou um efeito deletério. Das concentrações testadas, o tratamento com 50 mg L⁻¹ apresentou os melhores resultados, favorecendo significativamente o aumento das plântulas, número e comprimento das folhas e raízes, ganho de massa fresca e número de brotos formados. Com isso, o uso do extrato de *K. alvarezii* indica potencial de aplicação como um composto natural bioativo no cultivo *in vitro* de *E. secundum* devido ao seu notório efeito bioestimulante na morfogênese *in vitro* desta espécie.

Palavras chave: orquídeas, bioatividade, bioestimulantes, micropropagação, cultura de tecidos.

Introdução

Orchidaceae é considerada a maior família de plantas com flores, apresentando grande importância ornamental e paisagística (Dressler, 2005). Além disso, algumas espécies destacam-se por sua potencial aplicação na medicina tradicional (Lo et al., 2004), ou como flavorizante, a partir de sua essência extraída, em diferentes segmentos industriais (Sinha et al., 2008). As orquídeas, em geral, produzem muitas sementes, mas poucas germinam na natureza. Isso se deve ao fato de que sua germinação natural estar sujeita a alguns fatores extrínsecos, como interação com fungos micorrízicos, e também por suas sementes serem pequenas e desprovidas de reservas. Somado a isso, o extrativismo desenfreado para comercialização de orquídeas de interesse comercial tem colaborado com seu desaparecimento da natureza (Nogueira, 2005).

A tribo neotropical Epidendreae pertence à subfamília Epidendroideae, que é a maior dentre as cinco subfamílias de Orchidaceae, compreendendo mais de 500 gêneros (Dressler, 1993). Epidendreae divide-se em seis subtribos, sendo: Bletiinae, Chysinae, Coeliinae, Laeliinae, Pleurothallidinae e Poneriinae compreende cerca de 120 gêneros, apresentando mais de 6.000 espécies (Dressler, 2005).

Pinheiro e Barros (2007) descrevem o gênero *Epidendrum* como um dos mais importantes dentro da família, possuindo grande número de espécies com características neotropicais, amplamente distribuídas na América do Sul. O gênero, porém, sofre com o extrativismo por conta do crescente interesse comercial. Uma espécie que se destaca dentro do gênero é *Epidendrum secundum* Jacq., sendo considerada de grande importância, movimentando o comércio florístico, além da produção de híbridos (Massaro et al., 2012). A espécie caracteriza-se por indivíduos de hábitos epífitas, terrícolas ou rupículas, com flores que variam entre lilás e rosa, as quais florescem durante todo o ano (Stancik et al., 2009).

Para potencializar o processo germinativo e de desenvolvimento das orquídeas, técnicas de propagação *in vitro* têm sido aplicadas com sucesso. Os meios de cultura são soluções nutritivas que servem como substrato para a ocorrência do processo de germinação *in vitro* das sementes e desenvolvimento de plântulas. A formulação dos meios deve atender as demandas metabólicas e fisiológicas das espécies, fornecendo água, nutrientes essenciais e reguladores vegetais, que determinarão a forma como as plantas irão se desenvolver (Chugh et al. 2009).

Várias formulações vêm sendo testadas no cultivo *in vitro* de orquídeas e

às vezes são feitas variações, incluindo outras substâncias ou fontes de nutrientes, buscando assim otimizá-las.

Alguns estudos vêm sendo realizados com extratos vegetais como bioestimulantes, com diferentes aplicações como: enraizamento de estacas, germinação de sementes, e no cultivo *in vitro* (Goel et al, 2007; Souza et al, 2012). No cultivo *in vitro* vêm sendo relatada seus efeitos benéficos e estimulantes na germinação, indução de calos e embriogênese somática (Besson et al, 2010).

Dentre as algas utilizadas na agricultura, 29,8% são algas vermelhas (Rhodophyta), principalmente aquelas do gênero *Gracilaria*, *Hypnea* e *Kappaphycus*, onde se destaca a espécie *Kappaphycus alvarezii* (DAPPER et al, 2014). Rathore e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *K. alvarezii* sobre o crescimento e rendimento na produção de grãos na cultura de soja e, após aplicações foliares, observaram um aumento de 57% na produção de grãos nas plantas tratadas com extrato a 15%, quando comparado ao tratamento controle.

Neste contexto, investir em pesquisas que busquem a otimização das condições de cultivo *in vitro* e a elaboração de novos protocolos é de suma importância. Estes estudos podem garantir maior eficiência da técnica e assim acelerar

o desenvolvimento de espécies ameaçadas, para sua posterior reintrodução na natureza. Assim, o uso dos bioestimulantes no meio de cultura pode se tornar uma ferramenta interessante no campo da pesquisa com micropropagação, pois é uma alternativa natural ao uso dos reguladores vegetais, que muitas vezes oneram o processo, possibilitando também a regeneração de plantas e formação de novos brotos, aumentando o número de indivíduos daquela espécie.

Objetivos

O presente estudo buscou otimizar as condições de cultivo *in vitro* de *Epidendrum secundum* através da suplementação com extratos da alga marinha *Kappaphycus alvarezii* no meio de cultura de multiplicação, avaliando seus efeitos morfológicos. Neste intuito, o objetivo principal foi determinar a melhor concentração para desenvolvimento de plântulas, além de avaliar durante a aclimatização das plântulas as taxas de sobrevivência.

Material e Métodos

Preparo do extrato

As macroalgas da espécie *Kappaphycus alvarezii* foram dessalinizadas superficialmente com uma solução 0,5 M de formiato de amônio e, em

seguida, lavadas com água destilada para a remoção do formiato. O material foi seccionado em pequenos segmentos, congelado e liofilizado. Após a liofilização o material foi macerado em um pó fino com nitrogênio líquido e auxílio de gral e pistilo. O solvente (água) foi adicionado na proporção de 1 g de extrato em pó para 10 mL de solvente. O material foi extraído por 1 h à temperatura ambiente e centrifugado. A fase líquida foi coletada e reservada e o *pellet* reextraído em água. Após a centrifugação, os sobrenadantes da primeira e segunda extração foi unidos e liofilizados, obtendo-se o extrato aquoso seco utilizado nos experimentos.

Alongamento e desenvolvimento de plântulas

Plântulas de *E. secundum* previamente germinadas e cultivadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura composto de sais MS (Murashige e Skoog, 1962) reduzidos pela metade, suplementado com 3% de sacarose (p/v) e diferentes concentrações do extrato de *K. alvarezii* (0, 6, 12, 25, 50, 100 mg L⁻¹). Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8, antes da adição de 2,5 g L⁻¹ do agente geleificante Phytigel®. Os meios de cultura foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, sendo que a unidade experimental consistiu de um frasco de

capacidade de 300 mL (6,5 cm de diâmetro e 13 cm de altura) contendo seis plântulas.

As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C (dia) e 18 ± 2 °C (noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹. Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: alongamento da parte aérea, número médio e comprimento das raízes, número médio e comprimento das folhas, massa fresca das plantas e formação de brotos.

Transplântio e aclimatização de mudas

Plântulas com pelo menos três folhas e três raízes foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo o substrato comercial Vitaplan® (composto de húmus de minhoca e casca de pinus). Foram utilizadas 7 plantas e duas repetições.

As plântulas transplantadas foram aclimatizadas em casa de vegetação com iluminação artificial (intensidade luminosa de 13 μmol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 24 ± 5 °C durante o dia e 20 ± 5 °C durante a noite). A irrigação foi feita manualmente, uma vez ao dia, no início da manhã. Após 30, 60 e 90 dias foi avaliada porcentagem de sobrevivência.

Resultados e Discussão

Efeito do extrato no desenvolvimento

Após as 12 semanas de cultivo *in vitro*, o material vegetal foi avaliado conforme os parâmetros citados acima. Foi observado que nos tratamentos na concentração de até 50 mg L⁻¹ do extrato de *K. alvarezii* houve evidente e gradual estímulo do desenvolvimento das plântulas de *E. secundum*, quando comparadas às plântulas cultivadas no tratamento controle (sem a presença do extrato), conforme FIGURA 1.

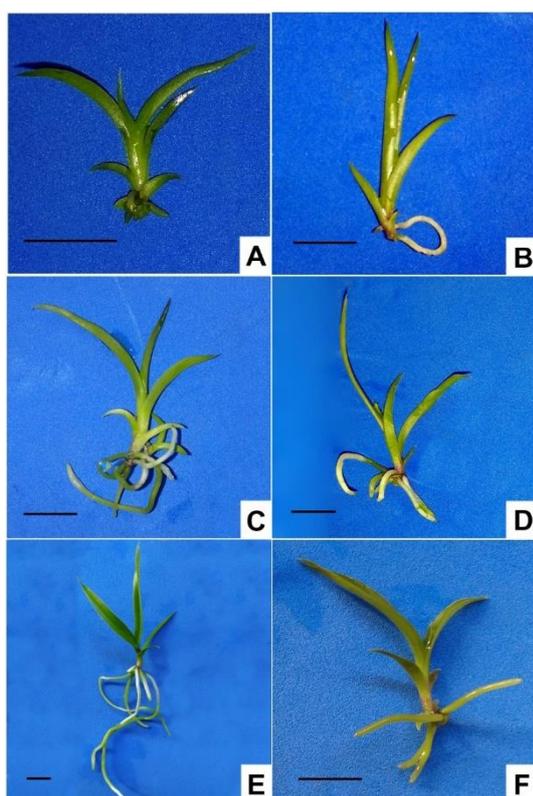


FIGURA 1. Desenvolvimento de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 na presença e ausência de diferentes concentrações de extrato da alga *Kappaphycus alvarezii*. A: controle; B: 6 mg L⁻¹;

C: 12 mg L⁻¹; D: 25 mg L⁻¹; E: 50 mg L⁻¹; F: 100 mg L⁻¹. Barra = 10 mm.

Ao longo dos 90 dias do experimento, não se observou oxidação do meio em quaisquer tratamentos na presença do extrato de *K. alvarezii*. Kumar, Ganesan e Rao (2008) descrevem o extrato de dessa alga como um potente agente antioxidante natural contra a degradação fenólica e oxidativa.

O extrato teve efeito positivo no alongamento das plântulas, onde o melhor tratamento observado foi de 50 mg L⁻¹, sendo o tamanho médio das plântulas de 6 mm, frente a média de 2 mm observado o tratamento controle, na ausência do extrato (FIGURA 2). Karthikeyan e Shanmugam (2017) também observaram promoção do crescimento em plantas de cana-de-açúcar ao administrar concentrações específicas do extrato da alga *K. alvarezii* via foliar.

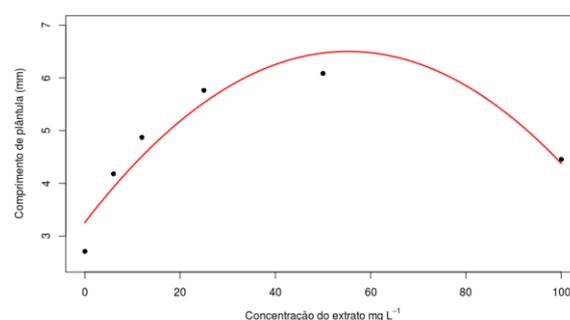


FIGURA 2. Comprimento médio (mm) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações

de extrato de *K. alvarezii*. Equação da reta: $y = -0.001x^2 + 0.1173x + 3.2570$. $R^2 = 0.8396$.

Assim como as demais variáveis analisadas, o comprimento de folhas e raízes se comportou de forma bastante semelhante (FIGURAS 3 e 4, respectivamente). Foi observado um aumento no comprimento desses órgãos vegetais na presença do extrato, com um ponto máximo na concentração de 50 mg L⁻¹, seguindo de um decréscimo na concentração de 100 mg L⁻¹.

Com o presente resultado, o extrato mostra-se eficaz ao estimular tanto a formação de sistema radicular quando de parte aérea na espécie avaliada.

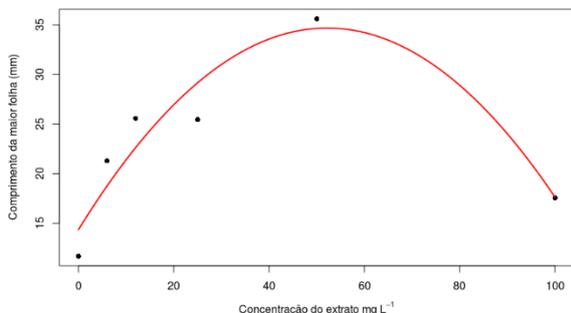


FIGURA 3. Comprimento médio das folhas (mm) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de extrato de *K. alvarezii*. Equação da reta: $y = -0.0074x^2 + 0.7791x + 14.34$. $R^2 = 0.8143$.

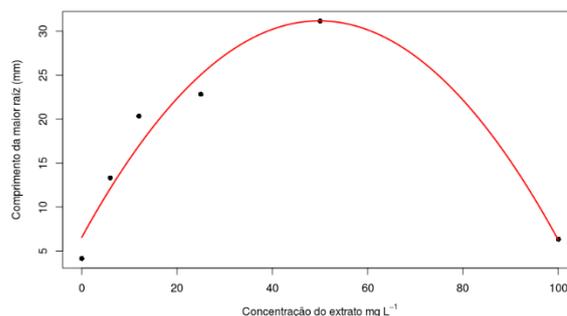


FIGURA 4. Comprimento médio das raízes (mm) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de extrato de *K. alvarezii*. Equação da reta: $y = -0.00991x^2 + 0.9880x + 6.5527$. $R^2 = 0.9273$. Valor de p: 0.009109.

A massa fresca das plântulas na maior parte dos tratamentos contendo o extrato de *K. alvarezii* também se mostrou bastante superior ao valor obtido nas plântulas do controle (FIGURA 5). A concentração de 50 mg L⁻¹ também indicou as maiores médias de ganho de massa, com uma média de 0,510 g, frente 0,130 g do tratamento controle. Karthikeyan e Shanmugam (2017), ao tratarem plantas de cana-de-açúcar via aplicação foliar do extrato de *K. alvarezii* também observaram aumento na massa fresca da planta.

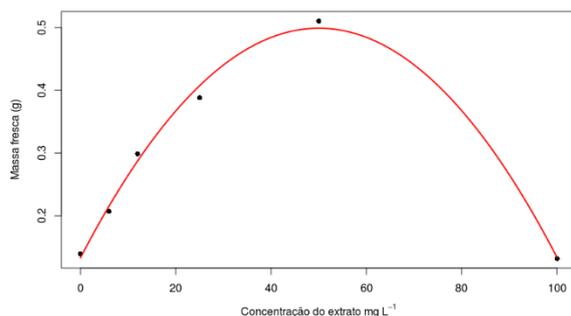


FIGURA 5. Ganho de massa fresca (g) de plântulas de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de extrato de *K. alvarezii*. Equação da reta: $y = -0.00014x^2 + 0.0146x + 0.1329$. $R^2 = 0.989$. Valor de p: 0.00053.

Por fim, pode-se observar também que houve efeito na formação de novos brotos a partir das plântulas inoculadas *in vitro*. Foi observado um aumento no número médio de brotos formados, com um pico na concentração de 50 mg L⁻¹ se mostrando significativamente superior aos demais tratamentos avaliados (FIGURA 6).

A formação de brotações adventícias, em geral, está relacionada com a atividade de citocininas, o que poderia ser atribuído a composição do extrato de *K. alvarezii*. Diversos autores salientam sobre a alta concentração de diversas citocininas naturais presentes na composição dos extratos de algas marinhas, atribuindo a esses o seu efeito biológico (TUHY; CHOJNACKA. 2015).

Contudo, ocorreu enraizamento bastante rápido dos tratamentos contendo o extrato de *K. alvarezii*, com o surgimento de novas raízes nos primeiros 15 dias. O processo de enraizamento, por sua vez, é dependente de auxinas.

Dessa maneira, nota-se que o extrato estimula tanto atividades atribuídas a auxinas quanto citocininas. Assim, é possível supor que a complexa composição do extrato parece não apenas fornecer auxinas ou citocininas, mas sim favorecer a produção endógena na própria planta, através de algum possível precursor.

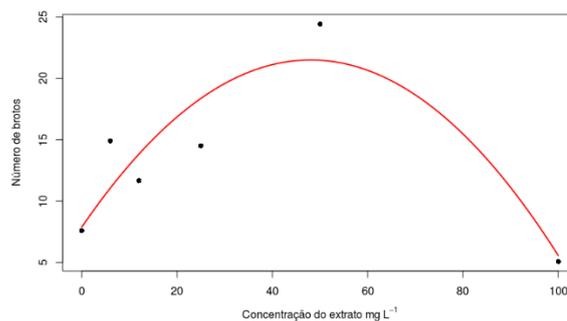


FIGURA 6. Número médio de brotos formados de *Epidendrum secundum*, após 12 semanas de cultivo em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de extrato de *K. alvarezii*. Equação da reta: $y = 0.0059x^2 + 0.5667x + 7.8802$. $R^2 = 0.6856$. Valor de p: 0.08195.

Taxa de sobrevivência das plântulas

Após três meses de aclimatização em casa de vegetação, plântulas provenientes do tratamento controle

apresentaram 50% de sobrevivência (não diferindo na taxa de sobrevivência observada entre as plântulas provenientes do tratamento contendo 6 mg L⁻¹ de extrato). As melhores respostas ocorreram entre as plântulas propagadas com concentrações mais elevadas do extrato, com uma média de 64 a 85% de sobrevivência (TABELA 1). Tal resultado pode indicar que o uso do extrato na propagação *in vitro* pode promover a sobrevivência de plântulas posteriormente transferidas para a condição *ex vitro*.

TABELA 1 – Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Epidendrum secundum* provenientes de diferentes tratamentos, durante aclimatização.

Tratamento	Sobrevivência (%)		
	30 dias	60 dias	90 dias
0	78	64	50
6	92	64	50
12	78	71	64
25	100	78	64
50	92	78	64
100	100	85	85

Conclusão

O extrato aquoso de *K. alvarezii* demonstrou um efeito extremamente positivo, estimulando enraizamento, desenvolvimento da parte aérea, ganho de massa fresca assim como formação de novos brotos das plântulas de *E.*

secundum, em determinadas concentrações.

Com base nos resultados obtidos, o uso do extrato de *K. alvarezii* indica potencial aplicação na cultura de tecidos e produção vegetal, por conta de seu efeito bioestimulante sobre as plantas.

Considerando a grande demanda do mercado por novas tecnologias e o crescente interesse na aplicação dos recursos marinhos, o presente trabalho apresenta dados relevantes sobre o potencial bioestimulante de tais extratos, que podem ser aplicados com sucesso para o cultivo de outras espécies de orquídeas e espécies de interesse ecológico/econômico.

Bibliografia

Besson, J.C.F., Oliveira, L.L., Cavalini, F.; Neiverth, W., Neves, A.F., Stefanello, S.E (2010). Influência de reguladores de crescimento e extratos vegetais na resposta morfogênética de calos de *Solanum sessiliflorum* Dunal. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente. v. 3, p. 311-322.

Dapper, T.B., Pujarra, S., Oliveira, A.J., Oliveira, F.G.O., Paulert, R (2014). Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: revisão. Revista em

Agronegócios e Meio Ambiente, v.7, nº 2, p. 295- 313.

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

Dressler, R.L. (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press. p. 314.

Goel, M. K., Kukreja, A.K., Singh, A.K.; Khanuja, S.P.S (2007). *In vitro* plant growth promoting activity of phyllocladane diterpenoids isolated from *Callicarpa macrophylla* Vahl. In shoot cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Nat Prod Commun.* 2:799.802.

Karthikeyan, K.; Shanmugam, M (2017). The effect of potassium-rich biostimulant from seaweed *Kappaphycus alvarezii* on yield and quality of cane and cane juice of sugarcane var. Co 86032 under plantation and ratoon crops. *Journal of Applied Phycology*.

Kumar, K.S., Ganesan, K., Rao, P.V.S (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chem.* 107:289–95.

Lo, S.F., Nalawade, S.M., Kuo Chen, C.L., Tsay, H.S (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and

ex vitro establishment of plantlets of *Dendrobium tosaense* Makino—a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* v. 40, p. 528–535.

Massaro, R.; Cordeiro, G.M.; Leal, T.S.; Moraes, C.P (2012). Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. em meios de cultivo simplificados. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, Maringá, v. 5, n. 2, p. 337-351.

Nogueira, R.E., Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Lanna, M.C.S., Mendonça, M.P. (2005). Mycorrhizal fungi associated to orchids growing in “campos rupestres” in “Quadrilátero Ferrífero” region, Minas Gerais State, Brazil, *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, p. 417-424.

Pinheiro, F., Barros, F. (2007) Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*, v. 25, p. 129- 136.

Rathore, S. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, v. 75, p. 351-355.

Russo, R.O., Berlyn, G.P (1990). The use of organic biostimulants to help low-input sustainable agriculture. Journal of Sustainable Agriculture. v. 1, 2. ed, p. 19-42.

Sinha, A. K., Sharma, U. K., Sharma, N. (2008) A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 59, p. 299-326.

Souza, M.F., Pereira, E.O., Martins, M.Q., Coelho, R.I., Junior, O.S.P (2012). Efeito do extrato de *Cyperus rotundus* na rizogênese. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, n. 1, p. 157-162.

Stancik, J. F., Goldenberg, R., Barros, F. (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 23, p. 864-880.

Tuhy, L., Chojnacka, K (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. Open Chemistry, vol. 13, no. 1, pp. 1183–1195.