

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

NATHASKIA SILVA PEREIRA

Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) com suplemento e meio alternativo
à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Dourados

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) com suplemento e meio alternativo
à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Autor: Nathaskia Silva Pereira

Orientadora: Dr.^a Cláudia Roberta Damiani

Co-orientador: Dr. Emerson Machado de Carvalho

Dissertação apresentada como parte das exigências do programa de pós-graduação em biologia geral/bioprospecção para a obtenção do título de “Mestre”.

Dourados

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P436c Pereira, Nathaskia Silva

Cultivo in vitro de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) com suplemento e meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) / Nathaskia Silva Pereira -- Dourados: UFGD, 2016.

65 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Roberta Damiani
Coorientador: Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho

Dissertação (Mestrado em Bioprospecção) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Micropropagação. 2. Microalgas. 3. BAP. 4. AIB. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"CULTIVO *in vitro* DE *Schomburgkia crispa* (ORCHIDACEAE) COM SUPLEMENTO E MEIO ALTERNATIVO À BASE DE *Chlorella sorokiniana* (CHLOROPHYCEAE)".

POR

NATHASKIA SILVA PEREIRA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF^a. DR^a. CLAUDIA ROBERTA DAMIANI
ORIENTADORA – UFGD



PROF. DR. GUSTAVO GRACIANO FONSECA
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF^a. DR. JOSÉ CARLOS SORGATO
MEMBRO TITULAR

Aprovada em 13 de julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes dois anos, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Ao meus pais e minha irmã que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Ao meu esposo William por aguentar a barra de todo o estresse dos períodos de provas e trabalhos, por sempre me acalmar e por toda a ajuda.

A minha orientadora Dr.^a Claudia Roberta Damiani por ter me aceito como sua aluna e também ao desafio deste projeto tão “diferente”. Obrigado pelo apoio e confiança, pela paciência, enfim pela orientação.

Ao meu co-orientador Dr. Emerson Machado de Carvalho que desde a minha graduação tem estado presente em todas as minhas realizações universitárias. Obrigada por todos os conselhos, apoio e confiança, essa é uma parceria que espero que vá muito longe ainda.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal que estiveram presentes no desenvolvimento deste trabalho, com horas de trabalho cansativo, mas também em bons momentos de descontração. Obrigado a todos, mas em especial Ademir, Thamiris, Brenda e Viviane.

As técnicas que sempre me ajudaram quando precisava de algum equipamento ou material e também se não sabia como algum equipamento funcionava, sempre me ajudaram, muito obrigada.

Ao Paulo Figueiredo, secretário do programa de Pós- Graduação pela sua disponibilidade 24h, você sempre foi muito competente e eficiente, sempre disposto a tirar as milhões de dúvidas sobre formulários, documentos e todas as situações burocráticas, muito obrigado pela paciência.

Aos meus amigos que fiz ao longo desses dois anos Fernanda e Mário vocês me ajudaram muito, principalmente com a “maravilhosa” Fisiologia Vegetal, mas muito mais do que isso obrigado pela grande amizade.

A Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção pela oportunidade de crescimento intelectual e pessoal. A CAPES pela bolsa concedida, que permitiu que eu estivesse sempre focada nas atividades pudesse dedicar todo o meu tempo a este trabalho.

Muito Obrigado

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

A *Schomburgkia crisper* Lindley (Orchidaceae), é uma epífita, encontrada em floresta de galeria e matas secas do Cerrado que, em condições naturais, apresenta dificuldades de propagação. Para avaliar a micropropagação *in vitro* de *S. crisper*, a presente pesquisa foi apresentada em dois capítulos. No capítulo 1 foi avaliado o desempenho da microalga *Chlorella sorokiniana*, como suplemento durante a multiplicação e enraizamento *in vitro* da *S. crisper*. No capítulo 2 foi avaliado o desempenho da microalga *C. sorokiniana*, como meio alternativo ao meio comercial WPM (Wood Plant Medium), durante a micropropagação *in vitro* da *S. crisper*. Dessa forma, no capítulo 1, foram utilizadas o meio cultivado e o sobrenadante da microalga *C. sorokiniana* numa densidade média de 107×10^5 células mL⁻¹ adicionados ao meio de cultura WPM em substituição da água destilada. Também foram acrescentados diferentes concentrações (0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB). Na multiplicação *in vitro* de *S. crisper* o meio de cultura WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP aumentou o número de brotações enquanto no enraizamento *in vitro* o meio WPM com 2,5 mg L⁻¹ de AIB suplementado com meio cultivado de microalgas promoveu um aumento no número de raízes. No capítulo 2, o meio cultivado e o sobrenadante da microalga *C. sorokiniana* numa densidade média de 108×10^5 células mL⁻¹ foram utilizadas como meio alternativo ao meio comercial WPM, durante a micropropagação *in vitro* da *S. crisper*. Explantes de *S. crisper* cultivados em meio de cultura com o meio cultivado ou o sobrenadante da microalga *C. sorokiniana* apresentaram resultados semelhantes aos cultivados em meio WPM. Desta forma foi constatada a possibilidade de utilizar a microalga *C. sorokiniana* como suplemento e meio alternativo ao meio WPM durante o cultivo *in vitro* de *S. crisper*.

Palavras-chave: Micropropagação; microalgas; BAP; AIB.

ABSTRACT

The *Schomburgkia crispera* Lindley (Orchidaceae), is an epiphyte, found in gallery forest and dry forests of the Cerrado, which, under natural conditions, presents difficulties of propagation. In order to evaluate the *in vitro* micropropagation of *S. crispera*, the present research was presented in two chapters. In chapter 1, the performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* was evaluated as a supplement during the multiplication and *in vitro* rooting of *S. crispera*. In chapter 2, the performance of *C. sorokiniana* microalgae was evaluated as an alternative to the WPM commercial medium (Wood Plant Medium) during the *in vitro* micropropagation of *S. crispera*. Thus, in chapter 1, the culture medium and supernatant of *C. sorokiniana* microalgae were used at an average density of $107 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ cells added to the WPM culture medium in place of distilled water. Different concentrations (0, 2.5 and 5.0 mg L⁻¹) of 6-benzylaminopurine (BAP) and indolebutyric acid (AIB) were also added. In the *in vitro* multiplication of *S. crispera* the WPM culture medium with 5.0 mg L⁻¹ of BAP increased the number of shoots while in *in vitro* rooting the WPM medium with 2.5 mg L⁻¹ of IBA supplemented with cultivated medium of microalgae promoted an increase in the number of roots. In chapter 2, the culture medium and the supernatant of *C. sorokiniana* microalgae at an average density of $108 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ cells were used as an alternative medium to the commercial WPM medium during the *in vitro* micropropagation of *S. crispera*. Explants of *S. crispera* cultivated in culture medium with the culture medium or the supernatant of *C. sorokiniana* microalga presented similar results to those cultured in WPM medium. In this way, it was possible to use the *C. sorokiniana* microalga as a supplement and an alternative medium to the WPM medium during the *in vitro* culture of *S. crispera*.

Key-words: Micropropagation; Microalgae; BAP; AIB.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	12
Objetivos.....	17

CAPÍTULO I- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) com suplemento à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Resumo.....	24
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	26
Avaliação e Análise dos Dados.....	28
Resultados.....	29
Multiplicação.....	29
Enraizamento.....	32
Discussão.....	35
Conclusão.....	37
Agradecimentos.....	37
Referências.....	38

CAPÍTULO II- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Resumo.....	41
Abstract.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	43
Avaliação e Análise dos Dados.....	44
Resultados.....	45

Discussão.....	48
Conclusão.....	49
Agradecimentos.....	50
Referências	50

Anexos

Anexo I- Artigo publicado no Journal of Applied Phycology.....	52
--	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Inflorescência de *Schomburgkia crisper* Lindley. A- Fonte: Vida no campo; B-Fonte: Mauro Peixoto.....13

Figura 2. Detalhe de amostra da microalga *Chlorella sorokiniana*. Foto: Pereira, N.S.....16

CAPÍTULO I- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) com suplemento à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Figura 1. Esquema ilustrando os nove tratamentos da primeira etapa do experimento, referente a fase de multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crisper* em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com sobrenadante (Sob) e meio cultivado (BL) de *Chlorella sorokiniana* e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).....28

Figura 2. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crisper* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento do meio de cultivo WPM32

Figura 3. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crisper* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento do meio de cultivo WPM.....35

CAPÍTULO II- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Figura 1. Esquema ilustrativo dos cinco tratamentos referentes a micropropagação *in vitro* de *Schomburgkia crisper* em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com sobrenadante (Sob) e meio cultivado (BL), e sobrenadante e meio cultivado de *Chlorella sorokiniana* acrescidos de agente gelificante (Ágar).....44

Figura 2. Efeito do meio de cultivo sobre o número e o comprimento médio das folhas de *Schomburgkia crisper*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido.....45

Figura 3. Efeito do meio de cultivo sobre o número e o comprimento médio das raízes de *Schomburgkia crisper*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido.....46

Figura 4. Efeito do meio de cultivo sobre o número médio de brotações de *Schomburgkia crisper*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido.....46

Figura 5. Efeito do meio de cultivo sobre a massa da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular de *Schomburgkia crisper*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido....47

Figura 6. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crisper* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido.....48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) com suplemento à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: NF- número médio de folhas; CM- comprimento médio das folhas; NR- número médio de raízes; NB- número médio de brotações; MFPA- massa fresca da parte aérea; MFSR- massa fresca do sistema radicular; MSPA- massa seca da parte aérea; MSSR- massa seca do sistema radicular, durante a etapa de multiplicação *in vitro*, de *Schomburgkia crisper*, cultivada em meio WPM suplementado com *Chlorella sorokiniana* e diferentes concentrações de BAP. GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação.....29

Tabela 2. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre o número e comprimento de folhas, taxa multiplicação e número de brotações, durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....31

Tabela 3. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre o número e comprimento de raízes durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....31

Tabela 4. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....31

Tabela 5. Resumo da análise de variância para as variáveis: NF- número médio de folhas; CM- comprimento médio das folhas; NR- número médio de raízes; NB- número médio de brotações; MFPA- massa fresca da parte aérea; MFSR- massa fresca do sistema radicular; MSPA- massa seca da parte aérea; MSSR- massa seca do sistema radicular, durante a etapa de enraizamento *in vitro*, de *Schomburgkia crisper*, cultivada em meio WPM suplementado com *Chlorella sorokiniana* e diferentes concentrações de AIB. GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação.....33

Tabela 6. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre o número e comprimento de folhas, taxa multiplicação e número de brotações, durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....34

Tabela 7. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre o número e comprimento de raízes durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....34

Tabela 8. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crisper*.....34

CAPÍTULO II- Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: NF - número de folhas; CM - comprimento das folhas; NR - número de raízes; NB - número de brotações;; MFPA - Massa fresca da parte aérea; MFSR - Massa fresca do sistema radicular; MSPA - Massa seca da parte aérea; MSSR - Massa seca do sistema radicular, durante a micropropagação *in vitro*, de *Schomburgkia crisper*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação.....45

INTRODUÇÃO GERAL

Orquídeas

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das angiospermas tornava-se diferenciada (GARAY, 1972). Ela encontra-se distribuída em quase todas as partes do mundo, exceto nas regiões polares e desérticas extremamente áridas e estima-se que existam no mundo cerca de 25.400 espécies divididas em cerca de 1.000 gêneros (BAPTISTA et al., 2011). Barros et al., (2016) catalogam 238 gêneros e 2.553 espécies, das quais 1.636 são endêmicas do Brasil. No Brasil, as orquídeas se desenvolvem em todos os estados, e em maior quantidade na Mata Atlântica, que vai de Pernambuco até o Rio Grande do Sul (REGO; FARIA, 2002).

Esta família uma das cinco mais representativas da flora do Cerrado (MARTINI et al., 2001; STANCATO et al., 2001). Segundo Barros et al., (2016) existem 730 espécies no domínio Cerrado. Entretanto, muitos representantes da família, devido ao elevado valor comercial, são extraídos de maneira ilegal e irracional da natureza, o que vêm dizimando e levando a um empobrecimento gradativo da biodiversidade nacional (CARNEIRO et al., 2001; MENEZES 1985; 1987).

Essas plantas destacam-se comercialmente devido à diversidade de tamanho, forma e cor das flores de rara beleza, durabilidade e da longevidade mantida por várias semanas, além do fato de algumas espécies apresentarem propriedades medicinais e culinárias (FARIA et al., 2012).

O gênero *Schomburgkia* apresenta poucos estudos relacionados à sua propagação e, conseqüentemente a sua conservação. Composto por aproximadamente 18 espécies de orquídeas, quase todas epífitas, encontradas na América Tropical e no Oeste da Índia.

Dentre as 18 espécies têm-se a *Schomburgkia crista* Lindl., uma epífita encontrada em floresta de galeria e matas secas do Cerrado, no alto das árvores em lugares bem iluminados, chegando a atingir de 40-50 cm de altura e sua flor de 2,5-3,0 cm de diâmetro (MENDONÇA et al., 1998) (Figura 1).

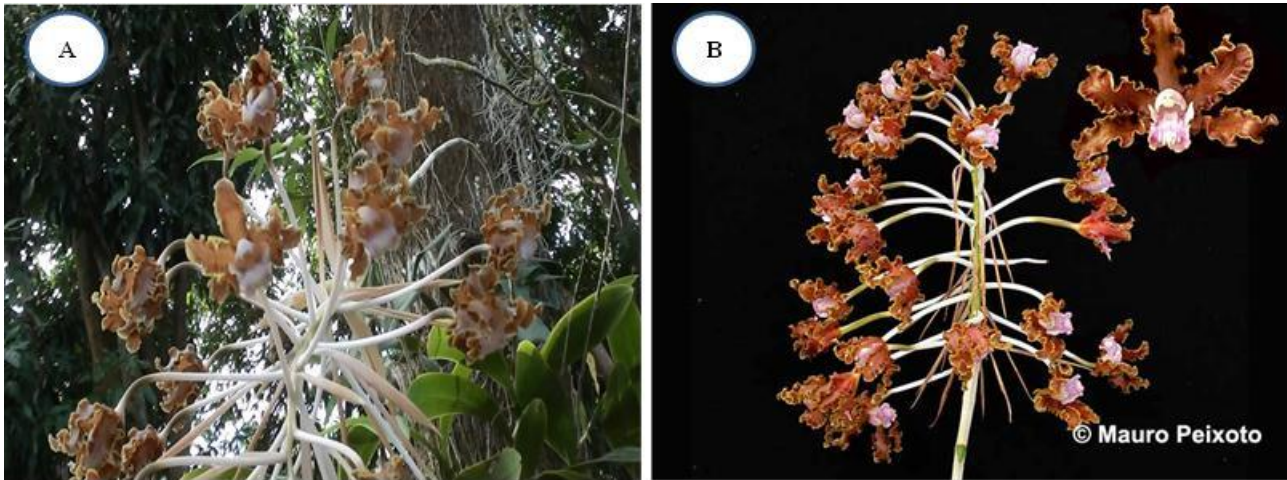


Figura 1. Inflorescência de *Schomburgkia crispa* Lindley. **A)** Fonte: Vida no campo, disponível em: https://i.ytimg.com/vi/g7IkkI_3AZI/maxresdefault.jpg e **B)** Fonte: Mauro Peixoto, disponível em: <http://www.brazilplants.com/orchidaceae/7/schomburgkia-crispa.html>.

Porém pouco se conhece sobre esta espécie nativa do Cerrado e, de acordo com a Fundação Biodiversitas (2007), a *Schomburgkia crispa* já se encontra na lista de espécies presumivelmente ameaçadas de extinção dentro da família Orchidaceae para o estado de Minas Gerais. Para o estado de Mato Grosso do Sul, no entanto, ainda não há informações suficientes para a classificação desta espécie. Diante do exposto, o estudo de tecnologias que permitam cultivar esta espécie fora do seu habitat pode ser uma importante ferramenta para conservação e manutenção da mesma. Dessa forma, as técnicas de cultivo *in vitro* podem representar uma excelente alternativa, tendo em vista que esta técnica já se mostrou bastante eficiente para outras espécies.

Cultivo *in vitro*

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de gemas adventícias ou laterais, do forma assexuada ou pela disseminação natural das sementes, sexuadamente, as quais são produzidas em cápsulas. Um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes, uma vez que são dependentes de micorrizas (RAMOS; CARNEIRO, 2007).

O cultivo *in vitro* por meio da micropropagação é uma alternativa para a propagação de diversas espécies (SOUZA et al., 2007). Desde 1975, ela tem sido utilizada no Brasil, para aumentar principalmente a produção de mudas e contribuindo para conservação *ex-situ* e redução do risco de extinção de diversas espécies (STANCATO et al., 2001), servindo como base de estudo dos aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (FERREIRA; SUZUKI, 2008).

No entanto, a técnica de cultivo *in vitro* exige o estudo das características intrínsecas para cada espécie, como os meios de cultivo e reguladores de crescimento, para que as mesmas tenham sucesso de germinação e crescimento.

Meio de cultivo e reguladores de crescimento

Os meios mais utilizados para o cultivo *in vitro* são o Knudson (1946), o Vacin e Went (1949) e o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo que cada meio específico é identificado pela composição e concentração de sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos (VENTURA et al., 2002).

Em orquídeas, o cultivo *in vitro* é feito normalmente em meio $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ou seja, com a metade da concentração de sais presente em sua formulação. Já a formulação do meio WPM foi desenvolvida especificamente para plantas lenhosas por Lloyd e McCown (1980), apresentando $\frac{1}{4}$ dos sais do meio MS. No entanto, estes meios, custam em média US\$ 55,00 a 70,00, o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o WPM (LLOYD; MC COWN, 1980), respectivamente, para produzir 10 L de meio de cultivo.

Os meios podem ser acrescidos de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* para suprir as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos, sendo o tipo e a concentração que geralmente determinam a resposta morfogênica. Uma das principais funções das auxinas nos vegetais é a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleótilos e formação de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2009). Já as citocininas são reguladores de crescimento que exercem importante papel na micropropagação, pois influenciam diretamente a expansão foliar, a quebra da dominância apical e a formação de gemas adventícias (POZO et al., 2005).

Entretanto, os reguladores de crescimento podem variar de US\$ 115,00 o grama da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) a US\$ 15,00 o grama da auxina ácido indolbutírico (AIB) (SIGMA, 2016). Neste sentido, o estudo de meios alternativos de baixo custo e elevada eficiência são fundamentais para o sucesso reprodutivo e a comercialização de *S. crispata*.

Meios alternativos

Na micropropagação *in vitro* há a necessidade do desenvolvimento de plantas que apresentem a mesma qualidade fisiológica das obtidas com o uso de formulações comerciais, porém utilizando-se meios que reduzam os custos de produção.

Dessa forma, muitos trabalhos têm descrito meios de cultura alternativos bastante simplificados e que, minimizam os custos da propagação *in vitro* de diversas orquídeas. É o caso da utilização de polpa de banana e de fertilizante (NPK 10:30:20) em *Laelia longipes* Rchb.f., *Laelia tenebrosa* Rolfe e *Miltonia spectabilis* Lindl., de forma que as plântulas cultivadas nesse meio apresentaram maior acúmulo de massa seca (STANCATO et al., 2008). Su et al. (2012) também utilizou meio contendo fertilizante (NPK 08:09:09) e adição de polpa de banana em *Dendrobium nobile* Lindl., o que se mostrou bastante eficiente. O mesmo ocorreu para a espécie *Vanda tricolor* Lindl, cultivada em polpa de banana e fertilizante (FAVETTA et al., 2014). Para *Cattleya bicolor* Lindl, o meio mais adequado para o desenvolvimento desta espécie foi o meio contendo polpa de coco (SOUZA et al., 2013).

Uma variedade de meios alternativos pode ser observado na literatura. Esses meios têm utilizado insumos e resíduos que, apesar do baixo custo tem permitido o sucesso da propagação *in vitro* de espécies de plantas. No entanto, é necessário que estes meios atendam as necessidades intrínsecas de cada espécie, bem como os diferentes períodos de desenvolvimento. As microalgas, por exemplo, podem se apresentar como uma suplementação importante para orquídeas, pois além de serem bioacumuladores de sais minerais podem auxiliar no desenvolvimento destas pela adição de reguladores de crescimento.

Microalgas

As microalgas apresentam grande potencial biotecnológico, como a elevada fixação de dióxido de carbono, biofixação de metais pesados, remoção de matéria orgânica de efluentes, além da produção, a partir de sua biomassa de biocombustíveis, de moléculas surfactantes (CARVALHO et al., 2012; SCHMITZ et al., 2012) e condicionador do solo na agricultura pela biofertilização (DERNER et al., 2006; TREJO et al., 2012).

Sendo uma nova opção de meio alternativo para o cultivo *in vitro*, considerando sua alta produção de biomassa em curto período de tempo, a necessidade de poucos nutrientes para o seu desenvolvimento e a possibilidade de cultivo em meios alternativo de baixo custo, como o fertilizante agrícola NPK (CARVALHO et al., 2012; SIPAUBA-TAVARES et al., 2009; 2011; 2015).

Além disso, estudos recentes detectaram concentrações de auxinas, citocininas, giberelinas e brassinosteróides em cepas de microalgas (STIRK et al., 2013a; STIRK et al., 2013b). Assim, é possível inferir o potencial biotecnológico das microalgas no cultivo *in vitro* de plantas superiores, uma vez que esses hormônios são essenciais para o desenvolvimento das mesmas.

O gênero *Chlorella* têm despertado interesse para diversos estudos (BASHAN et al., 2016; CHAKRABORTY et al., 2013; NEOFOTIS et al., 2016; TREJO et al., 2012; WAGENEN et al., 2015), devido à sua elevada produtividade, resistência a alterações do meio, capacidade de produzir uma variedade de lipídios, polissacáridos e outros produtos celulares que podem ser de interesse para a bioenergia ou produtos de elevado valor comercial (CAZZANIGA et al., 2014).

A microalga *Chlorella sorokiniana*, por exemplo, apresenta diâmetro de 2-4,5 μm de célula única, com crescimento mixotrófico em várias fontes de carbono, o que facilita o seu cultivo *in vitro* (LIZZUL et al., 2014) (Figura 2). Henrikson (2009) caracterizou o gênero *Chlorella* sendo composto por 60% de proteínas, 18 % de carboidratos, 10% de lipídios, 7% de minerais e 5% de umidade, além de Beta caroteno precursor da Vitamina A, Vitaminas C, Vitamina E, Vitamina B6, Vitamina B12, Tiamina (B1), Riboflavina (B2) e Ácido Nicotínico (B3), além de minerais, como Cálcio, Ferro, Magnésio Sódio, Potássio, Fósforo, Zinco.

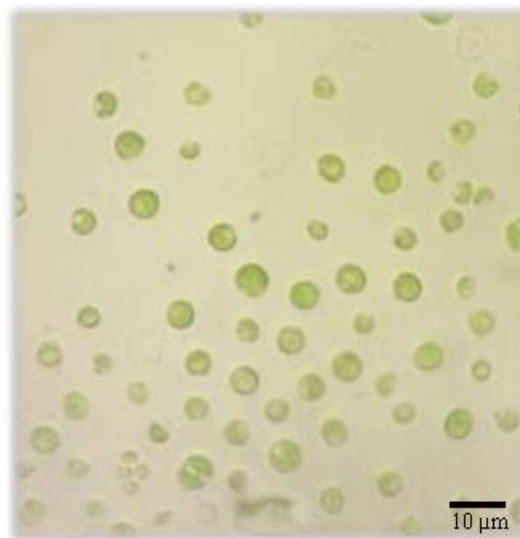


Figura 2. Detalhe de amostra da microalga *Chlorella sorokiniana*. Foto: Pereira, N.S. (2016).

Considerando o potencial biotecnológico que as microalgas vêm apresentando, é esperado que o uso das mesmas possa fornecer suplemento e/ou meio alternativo à formulação comercial durante a micropropagação *in vitro* de *Schomburgkia crispa*. Com isso poderá elevar a qualidade do material vegetal propagado e reduzir os custos de produção.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o crescimento de *Schomburgkia crista* durante a micropropagação *in vitro* em meio de cultivo contendo a microalga *Chlorella sorokiniana* como suplemento e meio alternativo à formulação comercial.

Específicos

Identificar o meio de cultivo mais adequado para o cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crista* durante a fase de multiplicação.

Identificar o meio de cultivo mais adequado para o cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crista* durante a fase de enraizamento.

A Dissertação de Mestrado foi dividida em dois capítulos, apresentados a seguir.

CAPÍTULO I: Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) com suplemento do meio à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Este primeiro capítulo apresenta os resultados da utilização da microalga *Chlorella sorokiniana* na forma de meio cultivado e de sobrenadante, resultante da centrifugação do meio cultivado no cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa*. Para tal, foram avaliadas duas fases da micropropagação, a multiplicação e o enraizamento *in vitro*. Dessa forma as microalgas suplementaram o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), em substituição da água destilada, com o sobrenadante e a meio cultivado, além da adição do regulador 6-benzilaminopurina (BAP), para a multiplicação *in vitro* e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro*.

CAPÍTULO II: Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

No segundo capítulo, avaliou-se a utilização da microalga *Chlorella sorokiniana* como suplemento e meio alternativo ao meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), para o cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispa*, sem a adição de reguladores hormonais. Dessa forma foram utilizados o sobrenadante e a meio cultivado das microalgas suplementando o meio WPM, em substituição da água destilada, assim como, o sobrenadante e a meio cultivado acrescidos somente de agente gelificante.

REFERÊNCIAS

Altman A (1999). Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, 2(2):51-55.

Baptista DH, Harding PA e Neto AD (2011). Orchids of Brazil: Oncidiinae I. **Associação Orquidófila Piracicabana**. 1ª edição. Brasil. p. 21-29.

Barros F De, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO e Guimarães LRS (2016). Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB69703>>.

Bashan Y, Lopez BR, Huss VAR, Amavizca E e De-Bashan EL (2016). *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. **Journal of Applied Phycology**, 28(1):113-121.

Carneiro MF, Carneio RIF, Oliveira AS, Leite Júnior CB, Pacheco RA, Souza MM e Ramos TV (2001). Bromélias e orquídeas na região dos Cerrados – Dados preliminares. In: **Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais**, 13. São Paulo. **Anais...** Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais. p. 13.

Carvalho EM, Ottonelli F, Ansilago M, Godoy HC, Nakagaki JM e Ramires I (2012). Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Reports –BBR**, 1 (2):14-18.

DOI 10.5433/2316-5200

Carvalho ACPP, Tombolato AFC, Rodrigues AA De J, Santos E De O e Silva F (2013). **Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais**. In: Junghans, T. G.; Souza, A. Da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2 ed. Embrapa, Parte 1, Cap.1: 13-53.

Cazzaniga S, Dall'osto L, Szaub J, Scibilia L, Ballottari M, Purton S e Bassi R (2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology biofuels**, 7:157.

DOI:10.1186/s13068-014-0157-z

Chakraborty M, McDonald AG, Nindo C e Chen S (2013). An α -glucan isolated as a co-product of biofuel by hydrothermal liquefaction of *Chlorella sorokiniana* biomass. **Algal Research**, 2: 230-236.

Derner RB, Ohse S, Villela M, De Carvalho SM e Fett R (2006). Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, 6(36): 1959 -1967.

Dezan LF, Canassa F, Souza-Leal T e Diogo JÁ (2012). Massaro, R.; Cordeiro, G. M. E Pedrosode-Moraes. C. Crescimento in vitro de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia (Arica)**, 30:53-58.

Faria RT, Assis AM, Unemoto LK e Carvalho JFRP (2012). **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Macenas, 124p.

Favetta V, Colombo RC, Faria RT (2014). Cultivo in vitro de Vanda tricolor Lindl. em meios de cultura simplificados. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), 57:114-117.

Ferreira WM e Suzuki RM (2008). O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Loiola MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68.

Fundação Biodiversitas (2007). **Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de minas gerais**. Belo Horizonte, MG. Disponível em: http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf

Garay L (1972). On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, 53: 202-215.

Grattapaglia D e Machado MA (1998). Micropropagação. In: Torres, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI-CNPH, VI, p.183-260.

Henrikson, R (2009). **Earth Food Spirulina How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet**. Library of Congress Catalog Card Number: 89-091683. ISBN 0-9623111-0-3.

Ibraflor (2015). **Análise Prospectiva para o Setor Atacadista de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil e suas Tecnologias de Informação**. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=237>

Jones HG (1973). The Genus *Schomburgkia*: A Study in the History and Bibliography of plant Taxonomy. **Taxon**, 22 (2-3): 229-239.

Junqueira AH e Peetz MS (2014). **Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira: balanço 2013 e perspectivas para 2014**. Disponível em: http://www.hortica.com.br/artigos/2014/2013_Comercio_Exterior_Floricultura.pdf

Knudson LA (1946). New nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, 15:214-217.

Kozai T e Kubota C (2001). Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**. Tokyo, 114:525-537.

Lloyd G e Mccown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, 30: 421-427.

Martini PC, Welladino L, Alves GD e Donato VMTS (2001). Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* in vitro germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36(10): 1319 – 1324.

Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Junior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE (1998). Flora vascular do cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. (Eds), **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA CPAC, Planaltina, Brasília. p. 289-556.

Menezes LC (1987). *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas Brasileiras. Rio de Janeiro: **Expressão e Cultura**. p. 11.

Menezes LC (1985). *Laelia purpurata*. Rio de Janeiro: **Expressão e Cultura**. p. 143.

Murashige T e Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497.

Neofotis P et al. (2016). Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, 15:164–178.

Pozo JCD et al. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, 123: 173-183.

Ramos TV, Carneiro IF (2007). Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquita* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, 37:10-15.

Rego IV, Faria RT (2002). Interação genótipo x meio nutritivo na propagação *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, Goiânia. **Resumos....** Goiânia: SBMP, 1:1- 3.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez VH, Dias JMM, Otoni WC, e Villani EMA (2012). Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres** [online], 59(1): 9-15. ISSN 0034-737X.

Schmitz R, Dal Magro C e Colla LM (2012). Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, 4(1): 48-60.

Sigma. Catálogo disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 03 de Março de 2016.

Sipaúba-Tavares LH, Ibarra LCC e Fioresi TB (2009). Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (reisch) Korsikov (chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, 35(1): 111-118.

Sipaúba-Tavares LH, Lusser Segali AMD, e Scardoelli-Truzzi B (2015). Aquatic Plants: Alternative Medium for Microalgae Growth. **Annals of Aquaculture and Research**, 2(1):1009.

Sipauba-Tavares LH, Millan RN, Berchielli FA, e Braga FMSB (2011). Use of alternative media and diferente types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 33(3): 247-253.

Souza JÁ, Schuch MW, Silva LC, Ferri J, e E Soares GC (2007). Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, 13(1):115-118.

Souza RLB, Lone AB, Faria RT, Oliveira KS (2013). Pulp fruit added to culture medium for *in vitro* orchid development. Polpa de frutos adicionada ao meio de cultivo no crescimento *in vitro* de orquídea. **Semina: Ciências Agrárias**, 34(3):1141-1146.

Stancato GC, Bemelmans PF, Vegro CLR (2001). Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 7(1): 25-33.

Stancato GC, Abreu MF e Furlani ÂMC (2008). Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia [online]**, 67(1):51-57.

ISSN 1678-4499. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000100006>

Stirk WA, Bálint P, Tarkovská D, Novák O, Strnad M, Ördög V e Van Staden J (2013b). Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry** (in press), 70:348–353.

Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolcík J, Strnad M, Bálint P e Van Staden J (2013a). Auxin and cytokinin relationships in twenty-four microalgae strains, **Journal of Phycology**, 49:459 – 467.

Su MJ, Schnitzer JÁ, Faria RT (2012). Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, 40(1):28–34.

Taiz L e Zeiger E (2009). **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.

Trejo A, Luz E, De-Bashan LE, Hartmann A, Hernandez JP, Rothballer M, Schmid M e Bashan Y (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. **Environmental and Experimental Botany**, 75:65– 73.

Vacin EF e Went FW (1949).Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, 110:605-617.

Ventura GM, Dias JMM, Teixeira LS, Carvalhos SV, Motoike YS, Novais FR e Cecon RP (2002). Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, 47:613-628.

Wagenen JV, Pape ML e Angelidaki I (2015). Characterization of nutrient removal and microalgal biomass production on an industrial waste-stream by application of the decelerationstat technique. **Water Research**, 75: 301-311.

CAPÍTULO I

Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crispera* (Orchidaceae) com suplemento do meio à base de
Chlorella sorokiniana (Chlorophyceae)

Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) com suplemento do meio à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Nathaskia Silva Pereira¹; Emerson Machado de Carvalho²; Claudia Roberta Damiani²

¹Mestranda em Biologia Geral/Bioprospecção- Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais- Universidade Federal da Grande Dourados; email: nathaskia.spn@outlook.com

²Professores Drs.da Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais- Universidade Federal da Grande Dourados; email: carvalho.em@gmail.com; claudiadamiani@ufgd.edu.br

RESUMO

A espécie *Schomburgkia crisper* Lindley (Orchidaceae) é uma epífita, encontrada em matas de galeria e matas secas do Cerrado, que em condições naturais apresenta dificuldades de propagação. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar o crescimento de *S. crisper* durante a multiplicação e enraizamento *in vitro* em meio de cultivo suplementado com a microalga *Chlorella sorokiniana*. O meio cultivado e o sobrenadante da microalga *C. sorokiniana* foram utilizados no meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), substituindo a água destilada e acrescidos de diferentes concentrações (0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) de 6-benzilaminopurina (BAP) ou ácido indolbutírico (AIB). O meio de cultura WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP aumentou o número de brotações e o meio WPM com 2,5 mg L⁻¹ de AIB suplementado com meio cultivado promoveu um aumento no número de raízes. Assim, a microalga *C. sorokiniana* pode ser utilizada como suplemento do meio WPM durante o cultivo *in vitro* de *S. crisper* na fase de enraizamento, pois promove maior desenvolvimento no número de raízes.

Palavras- chave: Orquídea; Microalga; Multiplicação; Enraizamento.

ABSTRACT

The species *Schomburgkia crisper* Lindley, (Orchidaceae) is an epiphyte found in gallery forests and dry forests of the Brazilian Cerrado, that under natural conditions, has difficulty of propagation. This research was developed in order to evaluate the performance of *S. crisper* during multiplication and rooting *in vitro* in culture medium supplemented with the microalgae *Chlorella sorokiniana*. The liquid biomass and the supernatant of *C. sorokiniana* microalgae were used in WPM (Wood Plant Medium), substituting distilled water and adding different concentrations (0, 2.5, and 5.0 mg L⁻¹) of 6-benzylaminopurine (BAP), and indolebutyric acid (IBA). The WPM culture medium with 5.0 mg L⁻¹ BAP increased the number of shoots and the WPM culture medium with 2.5 mg L⁻¹ IBA supplemented with liquid biomass promoted an increase in the number of roots. Then, the possibility of using *C. sorokiniana* microalgae as the supplement of the WPM medium during the *in vitro* culture of the *S. crisper* in rooting phase was found.

Key- words: Orchid; Microalgae; Multiplication; Rooting.

INTRODUÇÃO

A *Schomburgkia crispa* Lindlley, (Orchidaceae) é uma epífita, encontrada em florestas de galeria e matas secas do Cerrado, em lugares bem iluminados no alto das árvores, atingindo de 40-50 cm de altura e sua flor de 2,5- 3 cm de diâmetro (MENDONÇA et al., 1998). Ela está na lista de espécies presumivelmente ameaçadas de extinção dentro da família Orchidaceae para o estado de Minas Gerais (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2007). Entretanto, para o estado de Mato Grosso do Sul ainda não há informações suficientes para a classificação desta espécie.

Considerando as dificuldades de propagação natural das orquídeas (RAMOS; CARNEIRO, 2007), e no sentido de colaborar sobre a redução da pressão predatória sobre as orquídeas, existe a necessidade de otimizar sua multiplicação para conservar e reintroduzir as populações em seu habitat.

A micropropagação, por exemplo, é uma técnica que possibilita o cultivo rápido e em larga escala de novos genótipos, para a obtenção de plantas livres de doenças e de mudas de espécies difíceis de serem propagadas (DAMIANI; SCHUCH, 2008). Na micropropagação os reguladores de crescimento são importantes, pois, suprem as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

A compreensão das proporções dos reguladores de crescimento é essencial para o sucesso da micropropagação. A proporção da interação auxina/citocinina no meio de cultura é determinante para a resposta organogênica. Geralmente, um aumento da relação auxina/citocinina induz à formação de raiz, enquanto uma redução da relação auxina/citocinina induz à formação de brotos (TAKAHASHI, 2002).

Entre as auxinas, o ácido indol-butírico (AIB) tem sido o mais utilizado pelo fato de não causar fitotoxicidade ao explante em uma ampla faixa de concentração (IACONA; MULEO, 2010). Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de analisar a influência de AIB sobre o enraizamento *in vitro* de orquídeas, como em *Dendrobium sabin* (RAFIQUE et al., 2012) e *Oncidium baueri* (CAMARGO et al., 2015) e *ex vitro* em *Arundina bambusifolia*, *Dendrobium nobile*, e *Oncidium* sp. (MENGARDA et al., 2013), estes autores não relataram efeitos tóxicos decorrente das concentrações de AIB utilizadas. De forma que, menores concentrações de AIB promoveram maior desenvolvimento *in vitro* de raízes em *Dendrobium sabin* e *Oncidium baueri*, já no cultivo *ex vitro* a utilização de AIB promoveu enraizamento somente em *D. nobile* na concentração de 1200 mg L⁻¹.

As citocininas são reguladores de crescimento que exercem importante papel na micropropagação, pois influenciam diretamente a expansão foliar, a quebra da dominância apical e

a formação de gemas adventícias (POZO et al., 2005). Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Em orquídeas pode-se destacar os estudos realizados em *Dendrobium* (NAMBIAR et al., 2012), *Brassocattleya* (CARDOSO; ONO 2011) e *Phalaenopsis* (SUBRAMANIAN et al., 2009), os resultados indicaram que a aplicação de BAP aumentou a percentagem de inflorescência e contribuiu para o aumento no número de brotações, folhas e flores produzidas.

Entretanto, os reguladores de crescimento apresentam valores extensivamente caros, e alcançam valor de US\$ 115,00 o grama da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), a US\$ 15,00 o grama da auxina ácido indolbutírico (AIB) (SIGMA, 2016). Dessa forma, é necessária a busca de meio de cultivo *in vitro* alternativo, que reduza os custos e favoreçam o desenvolvimento de plantas com a mesma qualidade fisiológica das obtidas com o uso de formulações comerciais.

Uma nova opção de meio alternativo e/ou suplemento para meio de cultivo *in vitro*, é a utilização de microalgas. Estudos recentes detectaram concentrações de auxinas, citocininas, giberelinas e brassinosteróides em cepas de microalgas (STIRK et al., 2013a; STIRK et al., 2013b), demonstrando potencial biotecnológico para serem aplicadas no cultivo *in vitro* de plantas superiores, uma vez que esses hormônios são essenciais para o desenvolvimento das mesmas.

Desta forma, considerando o potencial biotecnológico da microalga *Chlorella sorokiniana* e a importância da *Schomburgkia crispa*, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o crescimento de *Schomburgkia crispa* nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro*, cultivada em meio suplementado pela microalga *Chlorella sorokiniana*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no período de julho de 2014 a julho de 2015. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS. O material vegetal foi constituído de microplantas de *Schomburgkia crispa* Lindley (Orchidaceae), previamente estabelecidas *in vitro*. Os explantes utilizados consistiram de segmentos caulinares com duas gemas laterais e gema apical na fase de multiplicação e quatro gemas laterais e gema apical no enraizamento, sendo as folhas mantidas nos segmentos em ambas as fases.

A cepa da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) foi adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32) linhagem e cultivada *in vitro* no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

A microalga foi cultivada em meio sintético NPK (CARVALHO et al., 2012) em laboratório, mantida em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro). Para a preparação da solução estoque de NPK, foram adicionados de 0,70 g de adubo químico NPK (20-5-20 g/L⁻¹) para cada 1.000 mL de água destilada, sendo a solução esterilizada em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Utilizou-se 10 mL da solução estoque para 1.800 mL de água destilada e 190 mL de amostra de microalga (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

As microalgas foram utilizadas nos experimentos na densidade média de 107×10^5 células mL⁻¹. Foram utilizadas a meio cultivado de *C. sorokiniana*, que é a microalga em seu meio de cultivo (água e NPK). E o sobrenadante obtido da centrifugação do meio cultivado das microalgas por 5 minutos à 3500 rpm.

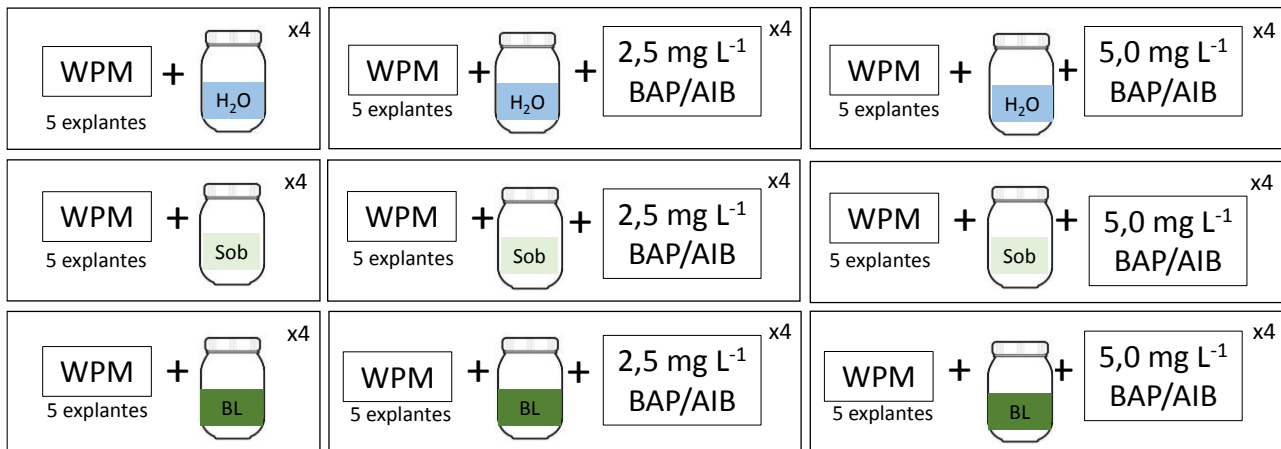
O meio cultivado e o sobrenadante da microalga *C. sorokiniana* foram utilizados no preparo do meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) (LLOYD; MCCOWN, 1980), substituindo a água destilada. Também foram avaliados no meio de cultura diferentes concentrações de regulador de crescimento.

Na primeira etapa, que se refere à multiplicação dos explantes de *S. crispera*, foram avaliados três concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e o meio WPM suplementado com meio cultivado e sobrenadante de *C. sorokiniana* e, testemunha sem suplementação de microalgas (Figura 1).

Na segunda etapa, que se refere ao enraizamento dos explantes de *S. crispera*, foram testados três concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e o meio WPM suplementado com meio cultivado e sobrenadante de *C. sorokiniana* e, testemunha sem suplementação de microalgas (Figura 1).

Cada etapa foi composta de nove tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco de cultivo, com cinco explantes cada.

Figura 1. Esquema ilustrando os nove tratamentos da primeira etapa do experimento, referente a fase de multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crista* em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com sobrenadante (Sob) e meio cultivado (BL) de *Chlorella sorokiniana* e concentrações de ácido indol-butírico (AIB) ou 6-benzilaminopurina (BAP).



Em cada frasco foram adicionados 30 mL do meio WPM preparado de acordo com o tratamento e acrescido de 100 mg L⁻¹ mio-inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose além do acréscimo dos fitorreguladores BAP e AIB, para a multiplicação e o enraizamento, respectivamente, de acordo com o tratamento. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6,0 g L⁻¹. Estes foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. Os explantes foram transferidos para frascos de vidro transparente com tampa plástica e com capacidade de 250 mL

Após a inoculação, os frascos de cultivo foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas e cultivados por 60 dias.

AVALIAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Após 60 dias de cultivo foram avaliados número de folhas (NF), comprimento de folhas (cm) (CF), número de raízes (NR), comprimento das raízes (cm) (CR), número das brotações (NB), comprimento das brotações (cm) (CB), massa fresca da parte aérea (mg) (MFPA), massa seca da parte aérea (mg) (MSPA), massa fresca do sistema radicular (mg) (MFSR) e massa seca do sistema radicular (mg) (MSSR).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

RESULTADOS

Multiplicação

Na fase de multiplicação *in vitro* de *Schomburgia crispera* Lindl, de modo geral, os fatores estudados exerceram influência significativa ($P < 0,5$). De acordo com a análise de variância (Tabela 1), o meio de cultivo foi significativo a 5% para comprimento de folhas e raízes e para as massas fresca e seca da parte aérea. Para o fator concentração de 6- benzilaminopurina (BAP) observou-se um efeito significativo (1 e 5%) para a maioria das variáveis estudadas, com exceção do comprimento de folhas. A interação dos dois fatores foi observada sobre o número de raízes e sobre as massas fresca e seca do sistema radicular.

Tabela 1. Resumo da análise de variância durante a etapa de multiplicação *in vitro*, de *Schomburgia crispera*, cultivada em meio WPM suplementado com *Chlorella sorokiniana* e diferentes concentrações de BAP.

GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação; NF- número médio de folhas; CF- comprimento médio das folhas; NR- número médio de raízes; CR- comprimento médio de raízes; NB- número médio de brotações; MFPA-

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios								
		NF	CF	NR	CR	NB	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR
Meio	2	0.120 ^{ns}	0.387 ^{**}	0.705 ^{ns}	0.355 ^{**}	0.023 ^{ns}	122903 ^{**}	6136 ^{ns}	2144 ^{**}	22.86 ^{ns}
Concentração	2	1.972 ^{**}	0.095 ^{ns}	28.76 ^{**}	6.480 ^{**}	2.003 ^{**}	46211 [*]	898492 ^{**}	1087 ^{**}	7040 ^{**}
Meio x Concentração	4	0.173 ^{ns}	0.118 ^{ns}	5.392 [*]	0.820 ^{ns}	0.426 ^{ns}	9885 ^{ns}	61293 ^{**}	92.95 ^{ns}	735.2 ^{**}
Resíduo	24	0.301	0.059	1.438	0.055	0.221	8817	2987	137	61.43
CV%		12.32	31.07	37.32	28.13	32.80	30.47	25.07	25.73	35.53
Média Geral		4.45	0.78	3.21	0,84	1.43	308	218	45.5	22.05

massa fresca da parte aérea; MFSR- massa fresca do sistema radicular; MSPA- massa seca da parte aérea; MSSR- massa seca do sistema radicular,

^{**}, ^{*} e ^{ns}, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Os explantes cultivados em meio sem regulador (BAP) apresentaram maior número e comprimento de folhas em comparação ao cultivo em meio contendo regulador. O número de folhas foi independente da formulação do meio, já o comprimento da lâmina foliar foi maior em meio WPM suplementado com o sobrenadante da microalga *Chlorella sorokiniana* (Tabela 2).

Ao contrário do observado nos resultados anteriores, a presença de BAP promoveu maior número de brotações. Observou-se que na adição de 5,0 mg L⁻¹ de BAP, o número de desenvolvimento das brotações foi superior, sendo observado, o número médio de 1,85 brotos por explante (Tabela 2).

Com relação ao desenvolvimento do sistema radicular, simultâneo a fase de multiplicação, explantes cultivados em meio sem adição de regulador apresentaram resultados superiores, sendo observada uma média 4,86 de raízes por explante, e 1,68 cm de comprimento. Porém o meio suplementado com o sobrenadante promoveu maior desenvolvimento no número médio de raízes (Tabela 3).

Pode-se dizer que o cultivo em meio WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP suplementado com sobrenadante, favorece o crescimento da parte aérea. Produzindo maior quantidade de biomassa,

tanto fresca quanto seca, apesar dos fatores estudados meio de cultivo e concentração do regulador terem apresentado efeitos isolados (Tabela 4).

Com relação massa fresca e seca do sistema radicular, observou-se que explantes cultivados em meio WPM sem regulador suplementado com sobrenadante das microalgas produziram maior quantidade de massa, apresentando uma relação direta com os valores obtidos para o número e comprimento de raízes (Tabela 4).

Tabela 2. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre o número e comprimento de folhas e número de brotações, durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispera*.

	Número de Folhas				Comprimento de Folhas				Número de Brotações			
					Concentração de BAP (mg L ⁻¹)							
	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.
WPM	4,9Aa	4,3Aab	3,7Ab	4,34 ^A	0,68Ba	0,6Aa	0,72ABa	0,7 ^B	1,0Ab	1,4Aab	1,9Aa	1,45 ^A
WPM+ Sobrenadante	4,9Aa	4,2Aa	4,4Aa	4,54 ^A	1,1Aa	0,8Aa	0,9Aa	0,99 ^A	1Aa	1,7Aa	1,4Aa	1,38 ^A
WPM+ Meio cultivado	4,9Aa	4,1Aa	4,3Aa	4,47 ^A	0,7ABa	0,7Aa	0,39Ba	0,7 ^B	1,0Ab	1,1Ab	2,2Aa	1,46 ^A
Média	4,9 ^a	4,3 ^b	4,2 ^b		0,88 ^a	0,76 ^a	0,70 ^a		1,03 ^b	1,41 ^{ab}	1,85 ^a	

Tabela 3. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre o número e comprimento de raízes durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispera*.

	Número de Raízes				Comprimento de Raízes			
					Concentração de BAP (mg L ⁻¹)			
	0	2,5	5,0	Média	0	2,5	5,0	Média
WPM	5,05ABa	3,17Aab	1,68Ab	3,30 ^A	1,80Aa	0,56ABb	0,35Ab	0,90 ^A
WPM+ Sobrenadante	5,86Aa	1,82Ab	1,12Ab	2,93 ^A	1,57A _a	0,15Bb	0,2Ab	0,64 ^B
WPM+ Meio cultivado	3,68Ba	3,91Aa	2,58Aa	3,39 ^A	1,66Aa	0,78Ab	0,45Ab	0,96 ^A
Média	4,86 ^a	2,97 ^b	1,8 ^b		1,68 ^a	0,5 ^b	0,33 ^b	

Tabela 4. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de BAP sobre as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular durante a multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispera*.

	Massa Fresca da Parte Aérea				Massa Fresca do Sistema Radicular				Massa Seca da Parte Aérea				Massa Seca do Sistema Radicular			
					Concentração de BAP (mg L ⁻¹)											
	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.
WPM	200Bb	216Bb	383Aa	266 ^B	557Ba	134Ab	7Ac	233 ^A	31Bb	36Bb	58ABa	42 ^B	52Aa	16Ab	2Aa	23 ^A
WPM+ Sobrenadante	404Aa	416Aa	450Aa	423 ^A	647Aa	9Bb	3Ab	228 ^A	53Aa	58Aa	68Aa	60 ^A	63Aa	1Bb	0,5Ab	21 ^A
WPM+ Meio cultivado	246ABb	153Bb	302Aa	234 ^B	361Ca	156Ab	58Ac	192 ^A	31Ba	28Ba	42Ba	34 ^B	32Ba	21Aab	8Ab	20 ^A
Média	283 ^{ab}	262 ^b	378 ^a		530 ^a	100 ^b	23 ^c		38 ^b	48 ^b	56 ^a		49,5 ^a	13 ^b	3,6 ^c	

Letras maiúsculas, na coluna, comparam os meios de cultura dentro da mesma concentração de BAP, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras minúsculas, na linha, comparam as diferentes concentrações de BAP dentro do meio de cultura, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras sobrescritas maiúsculas, na coluna, comparam as médias entre as concentrações de BAP dentro do mesmo meio de cultura, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras sobrescritas minúsculas, na linha, comparam as médias entre os meios de cultura dentro de diferentes concentrações de BAP, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao aspecto geral das microplantas, após 60 dias de cultivo (Figura 2), é possível observar que os explantes cultivados em meio contendo WPM com a suplementação de microalgas, seja na forma de sobrenadante ou meio cultivado, apresentaram raízes mais pigmentadas (verdes), independentemente da presença ou ausência de regulador; quanto ao aspecto das brotações, explantes cultivados em meio WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP apresentaram maior número de brotações.

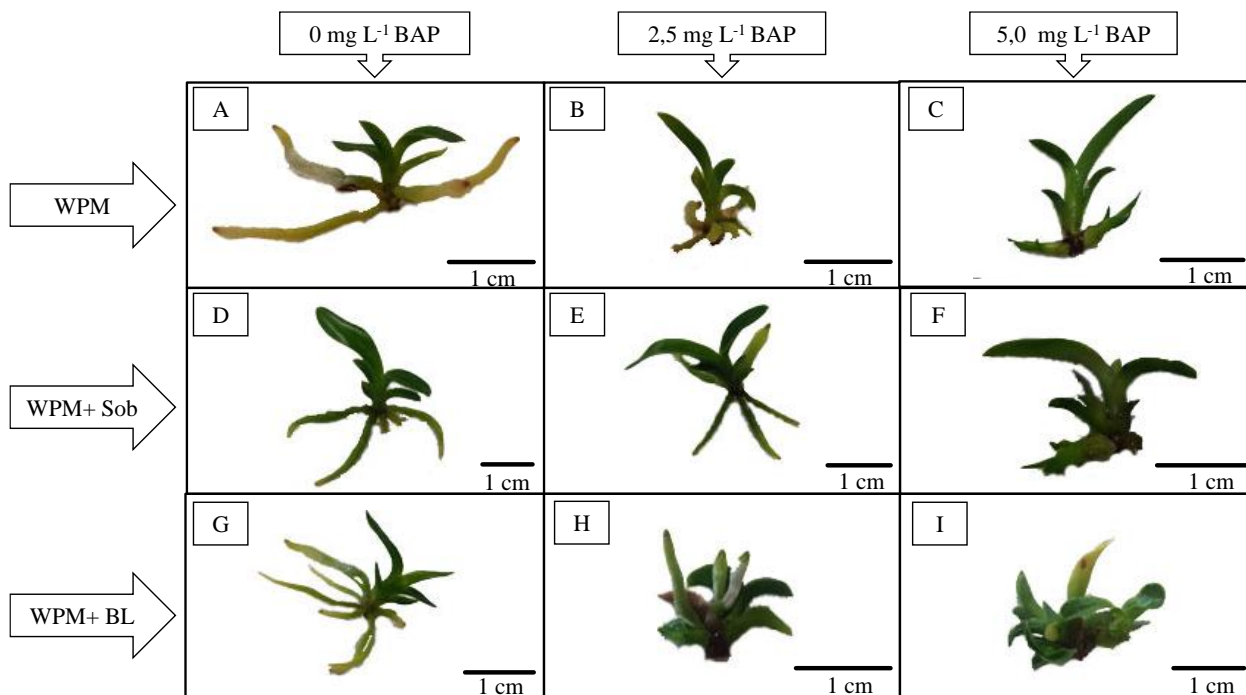


Figura 2. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crispa* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento do meio de cultivo WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980). A-WPM; B-WPM+2,5 mgL⁻¹ BAP; C-WPM+5,0 mgL⁻¹ BAP; D-WPM+ Sobrenadante; E- WPM+ 2,5 mgL⁻¹ BAP +Sobrenadante; F- WPM+ 5,0 mgL⁻¹ BAP+ Sobrenadante; G-WPM+ Meio cultivado; H- WPM+2,5 mgL⁻¹ BAP+ Meio cultivado; I- WPM+ 5,0 mgL⁻¹ BAP +Meio cultivado.

Enraizamento

Na segunda etapa, durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*, de acordo com a análise de variância (Tabela 5) observou-se um efeito significativo do meio de cultivo, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e a interação entre esses fatores. O meio de cultivo influenciou o desenvolvimento do número e comprimento de raízes e folhas, bem como o número de brotações. Já o uso de AIB nas diferentes concentrações estudadas foi significativo para o comprimento de folhas, número de brotações e para a massa fresca e seca do sistema radicular. O efeito da interação entre esses fatores durante o enraizamento *in vitro* foi observado no comprimento das folhas, número de brotações e na massa fresca e seca do sistema radicular.

Tabela 5. Resumo da análise de variância para as variáveis: GL- Grau de Liberdade; CV – Coeficiente de variação; NF- número médio de folhas; CM- comprimento médio das folhas; NR- número médio de raízes; NB- número médio de brotações; MFPA- massa fresca da parte aérea; MFSR- massa fresca do sistema radicular; MSPA- massa seca da parte aérea; MSSR- massa seca do sistema radicular, durante a etapa de enraizamento *in vitro*, de *Schomburgkia crista*, cultivada em meio WPM suplementado com *Chlorella sorokiniana* e diferentes concentrações de AIB.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios								
		NF	CF	NR	CR	NB	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR
Meio	2	1.76*	3.20**	19.80**	0.44**	0.18*	20620 ^{ns}	193398 ^{ns}	895.72 ^{ns}	1047 ^{ns}
Concentração	2	0.84 ^{ns}	0.81**	2.85 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.14*	39068 ^{ns}	579159**	617 ^{ns}	4273**
Meio x Concentração	4	0.73 ^{ns}	0.45**	1.94 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.21**	20791 ^{ns}	257268*	400.1 ^{ns}	2587.9**
Resíduo	24	0.32	0.06	0.86	0.07	0.03	11832	69709	410.33	566.37
CV%		12.53	16.41	21.42	21.39	17.02	26.64	38.44	31.74	36.33
Média Geral		4.48	1.43	4.33	1.22	1.09	408.29	686.81	63.81	65.49

** , * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste de Tukey.

Explantos cultivados em meio WPM com 5,0 mg L⁻¹ de AIB apresentaram maior número e comprimento médio de folhas. Entretanto, explantes cultivados em meio WPM com 5,0 mg L⁻¹ de AIB suplementado com o sobrenadante apresentaram maior número de folhas (4,9), enquanto que o meio WPM com 5,0 mg L⁻¹ de AIB suplementado com meio cultivado apresentou maior comprimento médio (2,45cm). Quanto ao número de brotações, explantes cultivados em meio WPM sem a adição de regulador apresentaram maior número médio (1,65) (Tabela 6).

Para o número de raízes, observou-se que explantes cultivados em meio contendo AIB, independentemente da concentração (2,5 ou 5,0 mg L⁻¹ de AIB) apresentaram maior número médio, quando comparadas ao tratamento sem regulador, assim como para o comprimento médio das raízes. Quanto a composição do meio de cultivo, explantes cultivados em meio contendo meio cultivado, apresentaram maior número de raízes (5,8). Diferentemente do número raízes, explantes cultivados em meio contendo meio cultivado foram os que apresentaram menor comprimento médio das raízes, apresentando maior comprimento médio em meio WPM (1,32cm) (Tabela 7).

Explantos cultivados em meio WPM com 2,5 mg L⁻¹ de AIB suplementado com meio cultivado, apresentaram um aumento na massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, quando comparados aos demais tratamentos (Tabela 8).

Tabela 6. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre o número e comprimento de folhas e número de brotações, durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*.

	Número de Folhas				Comprimento de Folhas				Número de Brotações			
					Concentração de AIB (mg L ⁻¹)							
	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.
WPM	4,56Aa	4,52Aa	4,8ABa	4,62 ^A	0,88Ba	1,09Ba	1,21Ba	1,06 ^B	1,65Aa	1,05Ab	1 Ab	1,23 ^A
WPM+ Sobrenadante	4,6 Aa	4,8 Aa	4,9 Aa	4,76 ^A	1,21ABa	1,34Ba	1,07Ba	1,21 ^B	1 Ba	1 Aa	1,15Aa	1,05 ^{AB}
WPM+ Meio cultivado	3,43Bb	4,85Aa	3,85Bb	4,04 ^B	1,31 Ab	2,45Aa	2,30Aa	2,02 ^A	1 Ba	1 Aa	1 Aa	1,0 ^B
Média	4.19 ^a	4.72 ^a	4.51 ^a		1.13 ^b	1.63 ^a	1.52 ^a		1.21 ^a	1.01 ^b	1.05 ^{ab}	

Tabela 7. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre o número e comprimento de raízes durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*.

	Número de Raízes				Comprimento de Raízes			
					Concentração de AIB (mg L ⁻¹)			
	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.
WPM	2,8Aa	3,73Ba	3,35Ba	3,32 ^B	0,99ABb	1,29Aab	1,68Aa	1,32 ^A
WPM+ Sobrenadante	4,15Aa	4,15Ba	3,37Ba	3,89 ^B	1,36Aa	1,33Aa	1,35ABa	1,34 ^A
WPM+ Meio cultivado	4,46Aa	6,53Aa	6,33Aa	5,77 ^A	0,87Ba	1,14Aa	1Ba	1,0 ^B
Média	3,83 ^b	4,80 ^a	4,35 ^{ab}		1,07 ^b	1,25 ^{ab}	1,34 ^a	

Tabela 8. Efeito do meio de cultivo com suplementação de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* e das concentrações de AIB sobre as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular durante o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*.

	MFPA				MFSR				MSPA				MSSR			
					Concentração de AIB (mg L ⁻¹)											
	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.	0	2,5	5,0	Méd.
WPM	350Aa	337Ba	434Aa	374 ^A	366Aa	667Aa	823ABa	619 ^A	53Aa	53Ba	66Aa	58 ^A	40Ab	58Aab	92Aa	64 ^A
WPM+ Sobrenadante	368Aa	406ABa	414Aa	396 ^A	630Aa	684Aa	508Ba	607 ^A	56Aa	58ABa	64Aa	59 ^A	60Aa	64Aa	45Ba	56 ^A
WPM+ Meio cultivado	310Ab	560Aa	493Aab	454 ^A	303Ab	1123Aa	1073Aa	833 ^A	56Aa	90Aa	74Aa	73 ^A	30Ab	100Aa	96Aa	75 ^A
Média	342 ^a	434 ^a	447 ^a		433 ^b	825 ^a	801 ^a		55 ^a	67 ^a	68 ^a		43 ^b	74 ^a	78 ^a	

Letras maiúsculas, na coluna, comparam os meios de cultura dentro da mesma concentração de AIB, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras minúsculas, na linha, comparam as diferentes concentrações de AIB dentro do meio de cultura, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras sobrescritas maiúsculas, na coluna, comparam as médias entre as concentrações de AIB dentro do mesmo meio de cultura, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Letras sobrescritas minúsculas, na linha, comparam as médias entre os meios de cultura dentro de diferentes concentrações de AIB, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao aspecto geral das microplantas na fase de enraizamento, após 60 dias de cultivo (Figura 3), é possível observar que os explantes cultivados em meio contendo WPM e WPM com meio cultivado, na presença e ausência de regulador apresentaram raízes mais desenvolvidas quando comparadas aos explantes cultivados em meio WPM com sobrenadante na presença e ausência de regulador.

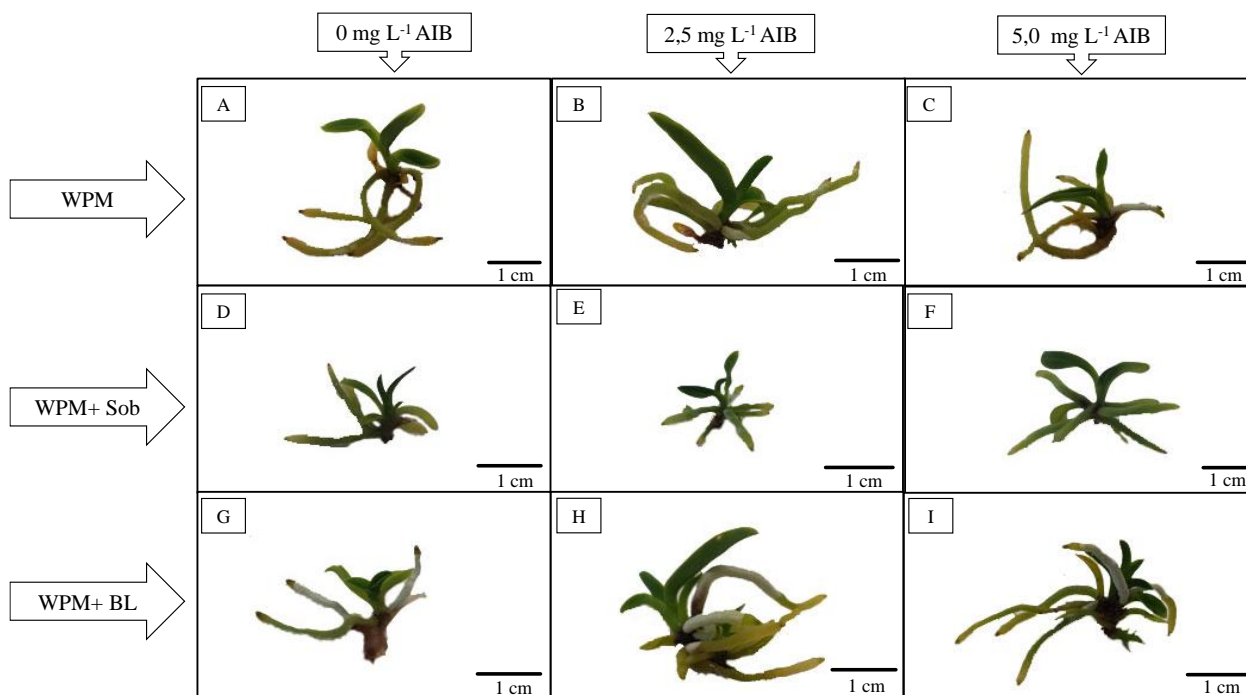


Figura 3. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crispata* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento do meio de cultivo WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980). A-WPM; B-WPM+2,5 mgL⁻¹ AIB; C-WPM+5,0 mgL⁻¹ AIB; D-WPM+ Sobrenadante; E- WPM+ 2,5 mgL⁻¹ AIB +Sobrenadante; F- WPM+ 5,0 mgL⁻¹ AIB + Sobrenadante; G-WPM+ Meio cultivado; H- WPM+2,5 mgL⁻¹ AIB + Meio cultivado; I- WPM+ 5,0 mgL⁻¹ AIB +Meio cultivado.

DISCUSSÃO

As citocininas exercem importante papel na micropropagação, pois influenciam diretamente a expansão foliar, a superação da dominância apical e a formação de gemas adventícias (POZO et al., 2005). Neste experimento, o efeito das citocininas sobre a expansão foliar não foi observado. Porém houve um aumento significativo do número de brotações em explantes cultivados em meio contendo BAP, principalmente na concentração de 5,0 mg L⁻¹.

De modo geral, o desenvolvimento de novas brotações causou a redução do crescimento foliar e simultaneamente a diminuição do número de folhas. A redução do crescimento foliar pode ser explicada pelo fato da indução e crescimento de um novo broto atuar como um dreno, desviando fotoassimilados que poderiam ser utilizados na expansão foliar. Por sua vez, ao aumentar o número de brotações, seria esperado o aumento concomitante do número de folhas. Porém, neste caso é

importante enfatizar que todos os protocormos formados foram avaliados como brotações, independentemente do estágio e da presença de folhas.

Para a multiplicação de *Schomburgkia crisper* tendo como objetivo a obtenção de maior número de brotações indica-se o uso do meio de cultura WPM e 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Pois quanto maior o número de brotos obtidos, maior o percentual de clones (mudas) produzidos.

Na preparação dos brotos para a fase de enraizamento indica-se a transferência do WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP para o meio WPM suplementado com sobrenadante sem a adição de regulador de crescimento, pois nesta condição de cultivo as microplantas apresentam maior vigor e produção de biomassa, além de apresentarem maior crescimento foliar, o que aumenta a área fotossintetizante, e como consequência melhorando a qualidade fisiológica da planta para a fase de enraizamento e mudança do estado mixotrófico para autotrófico.

É preciso considerar que na multiplicação *in vitro* o principal objetivo é produzir o maior número possível de propágulos geneticamente uniformes e que possam vir a serem enraizados na fase seguinte (CANHOTO, 2010). Conforme observado neste experimento, devido a ocorrência de enraizamento em *S. crisper* durante a fase de multiplicação, pode-se suprimir a fase seguinte (enraizamento), considerando que a microplanta produzida já está completa para o processo de aclimação. O enraizamento *in vitro* é de grande importância econômica, de conservação e de preservação de espécies já que aumenta a taxa de sobrevivência das mudas quando estas passam para a fase de aclimação.

No entanto é importante enfatizar que a aplicação da técnica de micropropagação na grande maioria dos casos tem como principal objetivo a produção de mudas em larga escala. Desta forma, o enraizamento direto, ainda na fase de multiplicação, inviabiliza ou reduz de forma considerável a obtenção de mudas em larga escala. Outro fator limitante do enraizamento simultâneo a multiplicação é que para a formação de raízes durante esta fase haverá uma divisão dos fotoassimilados entre parte aérea e sistema radicular, e como consequência a redução do número e crescimento das brotações.

A indução e o crescimento radicular são dependentes da presença de auxinas, enquanto que a indução e crescimento de gemas adventícias são controladas pela ação de citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2009), sendo estes efeitos regulados endogenamente pelo balanço hormonal auxina/citocinina. Um aumento dessa relação induz à formação de raiz, enquanto uma redução induz à formação de brotos (TAKAHASHI, 2002).

De acordo com os resultados obtidos, fica claro que a presença de AIB no meio de cultivo aumentou a relação auxina/citocinina, principalmente quando o meio foi suplementado com meio cultivado de *C. sorokiniana*, induzindo a formação de maior número de raízes. Na presença de BAP

houve um aumento na relação citocinina/auxina, promovendo o desenvolvimento de maior número de brotos.

Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes considerando a escassez de trabalhos sobre a espécie de orquídea apresentado e sobre o tipo de tecnologia empregada na utilização da microalga. Dentre os trabalhos encontrados, podemos citar Sousa et al., (2007) que analisaram a contaminação microbiana na propagação *in vitro* e Souza et al., (2014) que analisaram o uso antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento *in vitro* de *Schomburgkia crispera*. No entanto não é possível comparar os resultados encontrados nestes experimentos, pois os fatores estudados e as variáveis analisadas foram diferentes.

CONCLUSÃO

Para a multiplicação de *Schomburgkia crispera* tendo como objetivo a obtenção de maior número de brotações indica-se o uso do meio de cultura WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Para maior desenvolvimento da parte aérea, obtendo-se maiores valores de massa fresca, indica-se o uso do meio de cultura WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP suplementado com o sobrenadante de *Chlorella sorokiniana*.

Para a preparação dos brotos para a fase de enraizamento indica-se a transferência do WPM com 5,0 mg L⁻¹ de BAP para o meio WPM suplementado com sobrenadante sem a adição de regulador de crescimento.

Para o enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispera* sugere-se o uso do meio WPM com 2,5 mg L⁻¹ de AIB suplementado com meio cultivado.

Dessa forma, o desenvolvimento de *Schomburgkia crispera* foi beneficiado pelo cultivo *in vitro* em meio contendo a microalga *Chlorella sorokiniana*, tanto na forma de sobrenadante como de meio cultivado.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte técnico e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Aos técnicos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

REFERÊNCIAS

- Camargo SS et al., (2015). Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciencia Rural**, Santa Maria , 45 (11): 2007-2012.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141780>
- Canhoto JM (2010). **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra. 407 p.
- Cardoso JC, Ono EO (2011). *In vitro* growth of *Brassocattleya* orchid hybrid in different concentrations of KNO₃, NH₄NO₃ and benzylaminopurine. **Horticultura Brasileira**, 29: 359-363.
- Carvalho EM, Ottonelli F, Ansilago M, Godoy HC, Nakagaki JM, Ramires I (2012). Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Reports –BBR**, 1 (2):14-18.
DOI 10.5433/2316-5200.
- Damiani CR, Schuch MW (2008). Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, 30 (2): 482 – 487.
- Fundação Biodiversitas (2007). **Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de minas gerais**. Belo Horizonte, MG. Disponível em: http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf
- Grattapaglia, D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI-CNPH, VI, p.183-260.
- Iacona C, Muleo R (2010). Light quality affects in vitro adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock colt. **Scientia Horticulturae**, 125: 630-636.
Doi: 10.1016/j.scienta.2010.05.018.
- Lloyd GE, Mccown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, 30:421-427.
- Machado AA, Conceição AR (2002). **WinStat, sistema para análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA.
- Mendonça, RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Junior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE (1998). Flora vascular do cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. (Eds), Cerrado: ambiente e flora. **EMBRAPA CPAC**, Planaltina, Brasília, p. 289-556.
- Mengarda LHG et al. (2013). Efeito do AIB e do ácido bórico na formação e enraizamento de brotos laterais em estacas de orquídeas. **Revista Nucleus**, 10(2):139-149.
Doi:10.3738/1982.2278.923.

Nambiar N, Siang TC e Mahmood M (2012). Effect of 6-Benzylaminopurine on flowering of a *Dendrobium* orchid **Australian Journal of Crop Science**, 6(2): 225-231.
ISSN:1835-2707

Pozo JCD et al. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, 123: 173-183.

Rafique R, Fatima B, Mushtaq S, Iqbal MS, Rasheed M, Ali M e Hasan SZU (2012). Effect of indole-3-butyric acid (IBA) on in vitro root induction in *Dendrobium* orchid (*Dendrobium sabin H.*) **African Journal of Biotechnology**, 11(2): 4673-4675.
DOI: 10.5897/AJB11.2319.

Ramos TV, Carneiro IF (2007). Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquita*e pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, 37:10-15.

Sigma. Catálogo disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 03 de Março de 2016.

Sipauba-Tavares LH e Rocha O (2003). **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2ª. edição. São Carlos: Rima.

Sousa GC, Campos MRC e Clemente PL (2007). Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, 5:405-407.

Souza APR, Silva SR, Sorgato JC, Soares JS e Rosa YBCJ (2014). Antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento *in vitro* de *Schomburgkia crispa* lindl **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, 10(18):333.

Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, Novák O, Strnad M, Ördög V e Van Staden J (2013b). Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry** (in press), 70:348–353.

Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolcík J, Strnad M, Bálint P e Van Staden J (2013a).. Auxin and cytokinin relationships in twenty-four microalgae strains, **Journal of Phycology**, 49:459 – 467.

Subramaniam S, Rathinam X, Poobathy R e Sinniah U (2009). Establishment of *in Vitro Phalaenopsis* *Violacea* Plant Cultures from Flower-stalk Cuttings. **Advances in Natural and Applied Sciences**, 3(3):432-437.

Taiz L e Zeiger E (2009). Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.

Takahashi EK (2002). **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**.. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAPÍTULO II: Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crista* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Cultivo *in vitro* de *Schomburgkia crisper* (Orchidaceae) em meio alternativo à base de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

Nathaskia Silva Pereira¹; Emerson Machado de Carvalho²; Claudia Roberta Damiani²

¹Mestranda em Biologia Geral/Bioprospecção- Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais- Universidade Federal da Grande Dourados; e-mail: nathaskia.spn@outlook.com

²Professores Drs. da Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais- Universidade Federal da Grande Dourados; e-mail: carvalho.em@gmail.com; claudiadamiani@ufgd.edu.br

RESUMO

Diversos meios de cultivo alternativos têm sido utilizados no estudo do cultivo *in vitro* de orquídeas. Neste trabalho foi avaliado o desempenho de *Schomburgkia crisper* Lindley, durante a micropropagação *in vitro*, quando cultivada em meio alternativo à base da microalga *Chlorella sorokiniana*. Dessa forma os explantes foram testados em cinco fatores: somente meio WPM; meio WPM com sobrenadante de *C. sorokiniana*; meio WPM com meio cultivado de *C. sorokiniana* sobrenadante com ágar e meio cultivado com o ágar. Explantes de *S. crisper* cultivado em meio com sobrenadante e/ou meio cultivado da microalga *C. sorokiniana* apresentaram resultados semelhantes aos cultivados em meio WPM. Assim, é possível inferir sobre a utilização eficiente da microalga *C. sorokiniana* como meio alternativo ao meio WPM durante o cultivo *in vitro* de *S. crisper*.

Palavras-chave: Orquídea; Microalga; Micropropagação; Wood Plant Medium (WPM).

ABSTRACT

Different alternative culture medias have been used to study the orchid cultivation in vitro. In this work we evaluated the micropropagation in vitro of *Schomburgkia crisper* Lindley grown in alternative medium enriched with microalgae *Chlorella sorokiniana*. Thus, the explants were tested on five factors: only WPM; WPM medium with supernatant of *C. sorokiniana*; WPM with liquid biomass of *C. sorokiniana*; supernatant of *C. sorokiniana* with agar; and liquid biomass of *C. sorokiniana* with the agar. *S. crisper* explants cultured in media containing supernatant and / or liquid biomass of microalgae *C. sorokiniana* showed similar results to those grown in WPM. Thus, it is possible to infer about the efficient use of microalgae *C. sorokiniana* as an alternative means to WPM during in vitro culture of *S. crisper*.

Key-words: Orchid; Microalgae; Micropropagation; Wood Plant Medium (WPM).

INTRODUÇÃO

Para que a produção de mudas por técnicas de cultivo *in vitro* seja viável comercialmente, é necessária a busca de meios de cultivo alternativos às formulações comerciais, a fim de reduzir os custos. Além disso, os meios alternativos devem favorecer o desenvolvimento de mudas com a mesma qualidade fisiológica das obtidas com o uso de formulações comerciais. Os meios de cultivo comumente utilizados, como exemplo, o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MC COWN, 1980), apresentam valores extensivamente caros, em média US\$ 55,00 a 70,00 para produzir 10 L de meio de cultivo (SIGMA, 2016).

A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* que tem sido empregada para a propagação de plantas, pois possibilita o cultivo rápido e em larga escala de novos genótipos, a obtenção de plantas livres de doenças e a obtenção de mudas de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI; SCHUCH, 2008).

Um meio de cultura específico é identificado para cada espécie pela composição e concentração de sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos (VENTURA et al., 2002). Diversos meios de cultura alternativos e de baixo custo têm sido testados na propagação *in vitro* de orquídeas. São exemplos a utilização polpas de banana, tomate, chuchu, mamão, coco e fertilizante (NPK). No entanto, os meios que promoveram melhores resultados em orquídeas foram aqueles que utilizaram polpa de banana juntamente com o fertilizante (NPK) (STANCATO et al., 2008; SU et al., 2012; SOUZA et al., 2013; FAVETTA et al., 2014). Isso indica a necessidade de novos estudos que viabilizem meios alternativos para específicos para determinadas espécies de orquídeas.

Uma nova opção de meio alternativo para meio de cultivo *in vitro* pode estar nas microalgas, devido à sua elevada produtividade e termo resistência, capacidade de produzir um uma variedade de lipídios, polissacáridos e outros produtos celulares (CAZZANIGA et al., 2014), que são essenciais para o desenvolvimento das plantas. Entre as microalgas, a Chlorophyceae *Chlorella sorokiniana* têm se destacado pela elevada produtividade, tolerância a altas temperaturas e produção de compostos essenciais para o desenvolvimento das plantas (BASHAN et al., 2016; NEOFOTIS et al., 2016; STIRK et al., 2013a; STIRK et al., 2013b).

Dentre as espécies de orquídeas, a *Schomburgkia crispa* Lindlley se destaca pela beleza, rusticidade, raridade em algumas regiões e ausência de estudos que viabilizem sua micropropagação. Ela é uma epífita encontrada em florestas de galeria e matas secas do cerrado, em lugares bem iluminados no alto das árvores, atingindo de 40-50 cm de altura e sua flor de 2,5- 3 cm (MENDONÇA et al., 1998). Esta espécie está na lista de espécies presumivelmente ameaçadas de

extinção dentro da família Orchidaceae para o estado de Minas Gerais (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2007). Entretanto, para o estado de Mato Grosso do Sul ainda não há informações suficientes para a classificação desta espécie.

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar o desenvolvimento de *Schomburgkia crispa* durante a micropropagação *in vitro* com o uso da microalga *Chlorella sorokiniana* como meio de cultivo alternativo em detrimento do meio comercial Wood Plant Medium (WPM).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS. O material vegetal foi constituído de microplantas de *Schomburgkia crispa* Lindley (Orchidaceae), previamente estabelecidas *in vitro*.

As microalgas foram obtidas de cultivos *in vitro* realizados no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). As cepas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) foram cedidas pelo Instituto André Tosello (Ref. 211-32).

A microalga foi cultivada em meio sintético NPK (CARVALHO et al., 2012) em laboratório, mantidas em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro). Elas foram utilizadas nos experimentos na densidade média de 108×10^5 células mL⁻¹.

Na preparação dos meios de cultura foram utilizados o sobrenadante e a meio cultivado de *Chlorella sorokiniana* em quatro tratamentos (Figura 1). No primeiro tratamento foi utilizado o sobrenadante com WPM (Wood Plant Medium – LLOYD; MCCOWN, 1980); no segundo tratamento foi utilizado a biomassa líquida com WPM; no terceiro tratamento foi utilizado o sobrenadante com o agente gelificante Agar; no quarto tratamento foi utilizada a meio cultivado com o agente gelificante Agar. Também foi utilizado um controle com WPM e água destilada. Para obtenção do sobrenadante a meio cultivado das microalgas, ou seja, as microalgas em seu meio de cultivo foram centrifugadas por 5 minutos à 3500 rpm.

Os experimentos totalizaram quatro tratamentos e um controle, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco de cultivo, com cinco explantes cada. Os explantes utilizados consistiram de segmentos caulinares com 2 gemas laterais e gema apical, sendo as folhas mantidas nos segmentos (Figura 1).

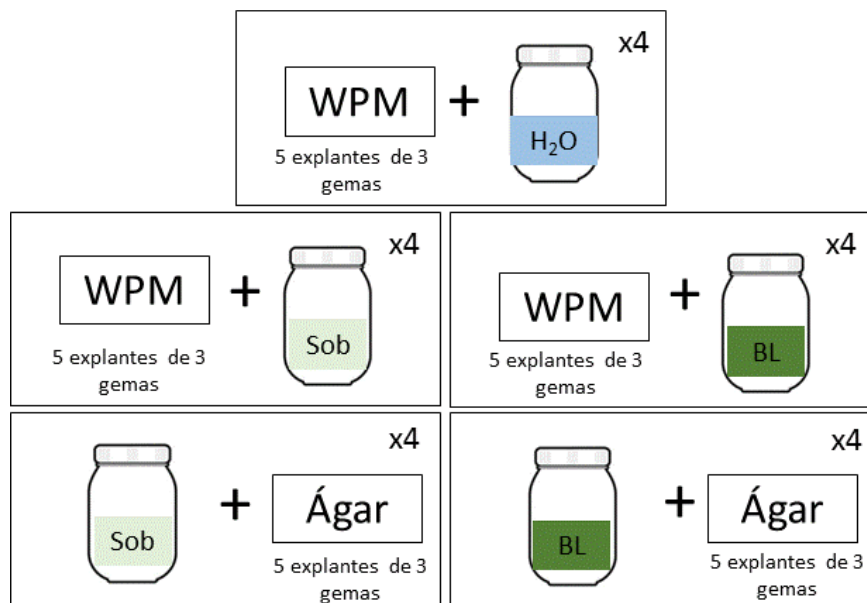


Figura 1. Esquema ilustrativo dos cinco tratamentos referentes a micropropagação *in vitro* de *Schomburgkia crispata* em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com sobrenadante (Sob) e meio cultivado (BL), e sobrenadante e meio cultivado de *Chlorella sorokiniana* acrescidos de agente gelificante (Ágar).

Os explantes foram transferidos para frascos de vidro transparente com tampa plástica e com capacidade de 250 mL, em cada frasco foram adicionados 30 mL do meio WPM, que com exceção do meio formulado somente com sobrenadante e/ou meio cultivado foram acrescidos de 100mg L^{-1} mio-inositol e 30g L^{-1} de sacarose. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de $6,0\text{g L}^{-1}$, estes foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos de cultivo foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com densidade de fluxo de fótons de $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, e cultivados por 60 dias.

AVALIAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Aos 60 dias de cultivo foram avaliados, o número de folhas (NF), comprimento de folhas (cm) (CF), o número de raízes (NR) e comprimento das raízes (cm) (CR), o número das brotações (NB) e comprimento das brotações (cm) (CB), a massa fresca da parte aérea (mg) (MFPA), massa seca da parte aérea (mg) (MSPA), a massa fresca do sistema radicular (mg) (MFSR) e a massa seca do sistema radicular (mg) (MSSR).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

RESULTADOS

De acordo com a análise de variância, os tratamentos com diferentes formulações do meio de cultivo exerceram influências significativas sobre o número médio de raiz e massa da matéria seca do sistema radicular (Tabela 1). Para as demais variáveis, os valores observados não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: NF - número de folhas; CM - comprimento das folhas; NR - número de raízes; NB - número de brotações; MFPA - Massa fresca da parte aérea; MFSR - Massa fresca do sistema radicular; MSPA - Massa seca da parte aérea; MSSR - Massa seca do sistema radicular, durante a micropropagação *in vitro*, de *Schomburgkia crisper*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. CV - Coeficiente de variação; GL- Grau de Liberdade.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios								
		NF	CF	NR	CR	NB	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR
Meio	4	0,014 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,066*	0,126 ^{ns}	0,001 ^{ns}	4279,4 ^{ns}	44462,7 ^{ns}	100,7 ^{ns}	786,6**
Resíduo	12	0,012	0,012	0,019	0,137	0,001	5999,1	24895,7	86,5	139,9
CV%		4,97	15,73	6,89	22,02	3,22	27,52	35,37	27,04	32,18
Média Geral		2,23	0,71	2,02	1,68	1,23	281,4	446	34,4	36,75

**, * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.DERF8GVC X = Taxa de multiplicação, WPM = Wood Plant Medium, Sob = Sobrenadante e BL = Meio cultivado obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido.

Quanto ao número e comprimento médio de folhas por explante (Figura 2), os resultados obtidos demonstraram que o meio de cultura, independentemente da formulação, não exerceu influência sobre estas variáveis, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos por meio do teste de comparação de médias aplicado (2,23 e 0,71, respectivamente).

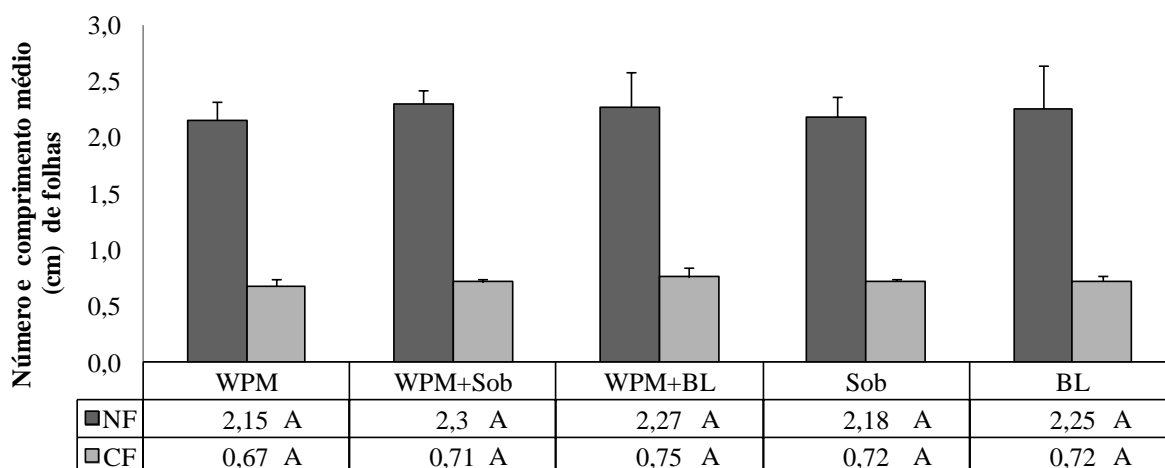


Figura 2. Efeito do meio de cultivo sobre o número e o comprimento médio das folhas de *Schomburgkia crisper*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. NF = número médio de folhas, CF = Comprimento médio de folhas, WPM = Wood Plant Medium, Sob = Sobrenadante e BL = Meio cultivado obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Com relação ao número médio de raízes observou-se uma diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3). Explantes cultivados em meio WPM e em WPM suplementado com sobrenadante ou meio cultivado de microalgas apresentaram maior número de raízes em comparação com explantes cultivados em meio contendo somente a meio cultivado. Também foi verificado um valor intermediário para os explantes cultivados em meio formulado com o sobrenadante das microalgas. Por outro lado, diferente do número de raízes, o comprimento das raízes não foi influenciado pela formulação do meio de cultura, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos.

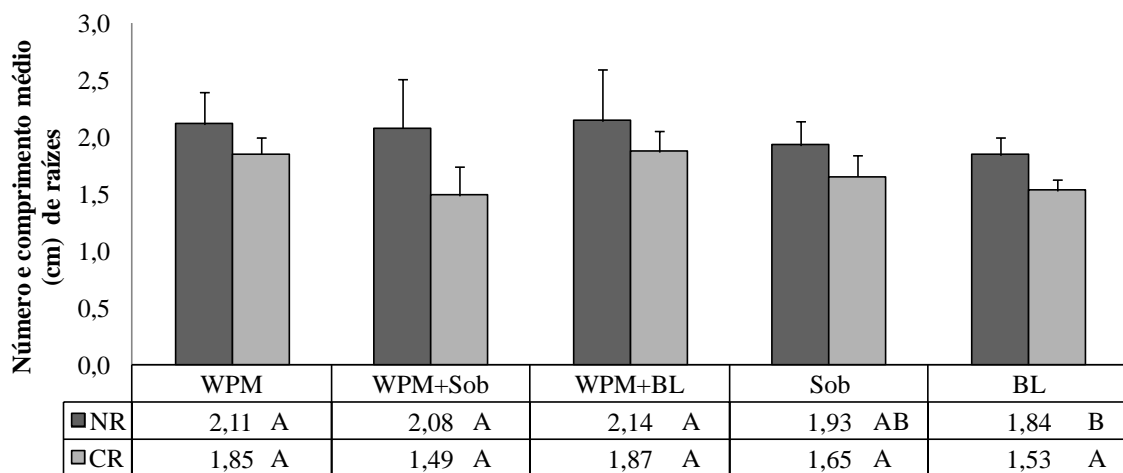


Figura 3. Efeito do meio de cultivo sobre o número e o comprimento médio das raízes de *Schomburgkia crista*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. NR = Número médio de raízes, CR = Comprimento médio de raízes, WPM = Wood Plant Medium, Sob = Sobrenadante e BL = Meio cultivado obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Para o número médio de brotações (Figura 4), as médias obtidas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

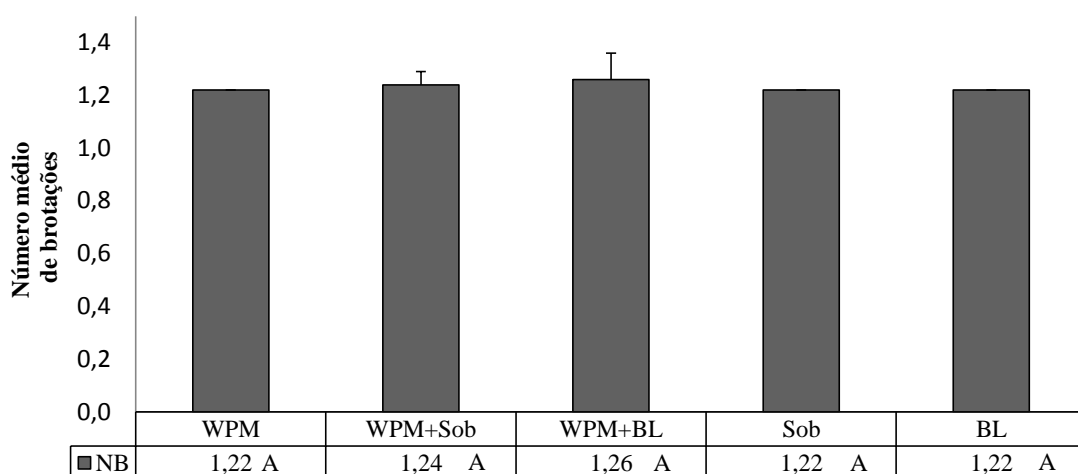


Figura 4. Efeito do meio de cultivo sobre o número médio de brotações de *Schomburgkia crista*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. NB = Número médio de brotações, WPM = Wood Plant Medium, Sob = Sobrenadante e BL = Meio cultivado obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio

líquido. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Quanto à massa da matéria fresca e seca da parte aérea e a massa fresca do sistema radicular (Figura 5) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, a massa seca do sistema radicular foi significativamente influenciada pelo meio de cultivo. Semelhante ao número de raízes, explantes cultivados em meio WPM e em WPM suplementado com meio cultivado apresentaram maiores valores de massa seca.

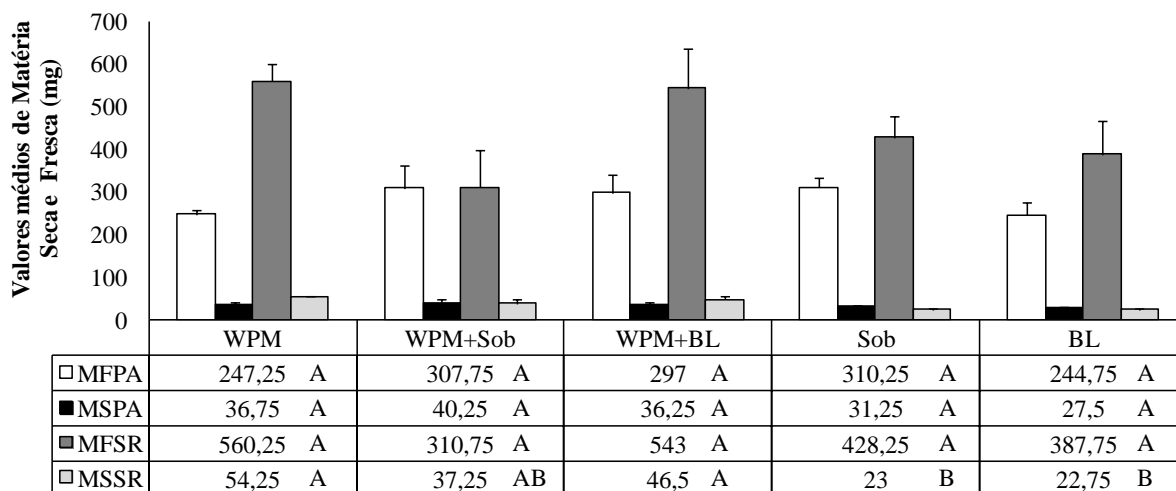


Figura 5. Efeito do meio de cultivo sobre a massa da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular de *Schomburgkia crista*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. MFPA = Matéria fresca da parte aérea, MFSR = Matéria fresca do sistema radicular, MSPA = Matéria seca da parte aérea, MSSR = Matéria seca do sistema radicular, WPM = Wood Plant Medium, Sob = Sobrenadante e BL = Meio cultivado obtidos do cultivo de *C. sorokiniana* em meio líquido. Médias seguidas por letras iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao aspecto geral das microplantas (Figura 6), é possível observar que os explantes cultivados em meio contendo WPM e WPM suplementado com microalgas, seja na forma de sobrenadante ou de meio cultivado, as raízes desenvolvidas foram mais alongadas e menos espessas. Em meio contendo somente sobrenadante ou meio cultivado, as raízes foram mais curtas e mais espessas. Com relação ao aspecto das brotações, pode-se observar que em explantes cultivados em meio WPM suplementado com sobrenadante, os brotos apresentaram maior número de entrenós, folhas mais pigmentadas e com o limbo mais espesso.

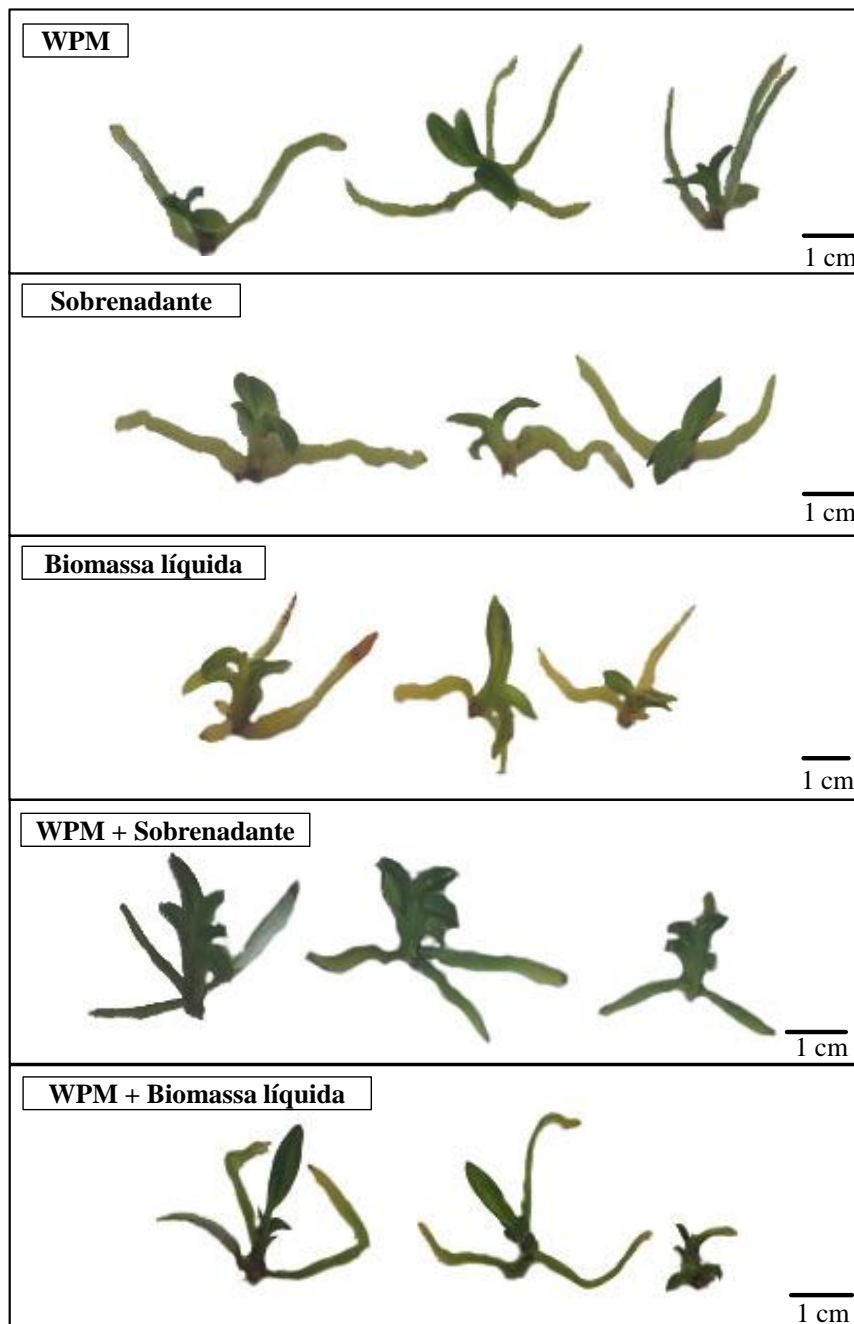


Figura 6. Aspecto geral das microplantas de *Schomburgkia crisper* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, utilizando *Chlorella sorokiniana* como suplemento e/ou meio. WPM = Wood Plant Medium.

DISCUSSÃO

A utilização da microalga *C. sorokiniana* de forma isolada como sobrenadante e meio cultivado promoveram o desenvolvimento *in vitro* dos explantes de *S. crisper* semelhantes aos cultivados em meio WPM. No entanto foi observada uma exceção para as variáveis número de raízes e massa da matéria seca radicular que apresentaram menores médias quando cultivados no meio contendo somente meio cultivado.

As microalgas são ricas em diversos micro e macro nutrientes, Henrikson (2009) caracterizou o gênero *Chlorella* sendo composto por 60% de proteínas, 18 % de carboidratos, 10% de lipídios, 7% de minerais e 5% de umidade, vitaminas como Beta caroteno, Vitaminas C, Vitamina E, Vitamina B6, Vitamina B12, Tiamina (B1), Riboflavina (B2) e Ácido Nicotínico, além de minerais como Cálcio, Ferro, Magnésio Sódio, Potássio, Fósforo, Zinco. Os macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, e magnésio, possuem função estrutural nas plantas, enquanto que o ferro, manganês e zinco, são micronutrientes que fazem parte das enzimas e têm função reguladora.

É importante salientar que as microalgas também podem beneficiar o crescimento das plantas, devido à produção de metabólitos secundários, com atividade hormonal, semelhante aos reguladores de crescimento geralmente utilizados nos meios de cultura. Neste sentido, estudos prévios conduzidos por Stirk et al., (2013a) e Stirk et al., (2013b), comprovaram a existência em microalgas, de auxinas, citocininas, giberelinas e brassinosteróides, além das substâncias como vitaminas, aminoácidos e polipeptídios (MOSTAFA, 2012), essenciais para o desenvolvimento *in vitro* vegetal.

Outros autores também têm tido bons resultados utilizando as microalgas como suplemento do meio de cultura *in vitro* de milho (JAGER et al., 2010), pera, tabaco e beterraba (MOLNAR; ORDOG, 2005) e de orquídeas (VIRÁG et al., 2011).

Considerando que para a maioria das variáveis estudadas não houve diferenças significativas entre as médias observadas nos diferentes meios de cultivo testados, é possível conjecturar que a formulação comercial de meio de cultivo, neste caso, WPM, possa ser substituída pelo uso de meio alternativo da microalga *C. sorokiniana*, quer seja sobrenadante ou a meio cultivado para o cultivo *in vitro* de *S. crista*.

Porém, recomenda-se o uso da biomassa líquida como meio alternativo pois para a obtenção do sobrenadante é necessário a utilização de uma centrífuga, o que acarreta no aumento do custo da produção das microplantas em escala comercial.

CONCLUSÃO

O cultivo *in vitro* de *S. crista* pode ser realizado em meio alternativo à base de sobrenadante e meio cultivado da microalga *C. sorokiniana* em detrimento do meio WPM durante, sem que se perca a qualidade das plântulas.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte técnico e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Aos técnicos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

REFERÊNCIAS

Bashan Y, Lopez BR, Huss VAR, Amavizca E e De-Bashan EL (2016). *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. **Journal of Applied Phycology**, 28(1):113-121.

Carvalho EM, Ottonelli F, Ansilago M, Godoy HC, Nakagaki JM e Ramires I (2012). Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry and Biotechnology Reports –BBR**, 1 (2):14-18.
DOI 10.5433/2316-5200

Cazzaniga S, Dall'osto L, Szaub J, Scibilia L, Ballottari M, Purton S e Bassi R (2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology biofuels**, 7:157.
DOI:10.1186/s13068-014-0157-z

Damiani CR, Schuch MW (2008). Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, 30 (2): 482 – 487.

Favetta V, Colombo RC, Faria RT (2014). Cultivo in vitro de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), 57:114-117.

Fundação Biodiversitas (2007). **Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de minas gerais**. Belo Horizonte, MG. Disponível em: http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf

Henrikson, R (2009). **Earth Food Spirulina How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet**. Library of Congress Catalog Card Number: 89-091683. ISBN 0-9623111-0-3.

Jäger K, Bartók T, Ördög V e Barnabás, B (2010). Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. **South African Journal of Botany**, 76: 511–516.

Lloyd GE, Mccown B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, 30:421-427.

- Machado AA, Conceição AR (2002). **WinStat, sistema para análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA.
- Mendonça, RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Junior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE (1998). Flora vascular do cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. (Eds), Cerrado: ambiente e flora. **EMBRAPA CPAC**, Planaltina, Brasília, p. 289-556.
- Molnár Z e Ördög V (2005). Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). **Acta Biologica Szegediensis**, 49(1-2):39-40.
- Mostafa SSM (2012). Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications, **Plant Science**, Dr. Nabin Kumar Dhal (Ed.), ISBN: 978-953-51-0905-1, InTech.
DOI: 10.5772/53694.
- Murashige T e Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497.
- Neofotis P et al. (2016). Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, 15:164–178
- Sigma. Catálogo disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 03 de Março de 2016.
- Souza RLB, Lone AB, Faria RT, Oliveira KS (2013). Pulp fruit added to culture medium for in vitro orchid development polpa de frutos adicionada ao meio de cultivo no crescimento in vitro de orquídea. **Semina: Ciências Agrárias**, 34(3):1141-1146.
- Stancato GC, Abreu MF e Furlani ÂMC (2008). Crescimento de orquídeas epífitas in vitro: adição de polpa de frutos. **Bragantia [online]**, 67(1):51-57.
ISSN 1678-4499. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000100006>
- Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, Novák O, Strnad M, Ördög V e Van Staden J (2013b). Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry** (in press), 70:348–353.
- Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolcík J, Strnad M, Bálint P e Van Staden J (2013a).. Auxin and cytokinin relationships in twenty-four microalgae strains, **Journal of Phycology**, 49:459 – 467.
- Su MJ, Schnitzer JÁ, Faria RT (2012). Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo in vitro de orquídea. **Científica**, 40(1):28–34.
- Ventura GM, Dias JMM, Teixeira LS, Carvalhos SV, Motoike YS, Novais FR e Cecon RP (2002). Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, 47:613-628.
- Virág E, Molnár Z e Ördög V (2011). Application of algal biomass for enhanced acclimatization of orchids. **Acta Biologica Szegediensis**, 55(1):179-181.

Application of Chlorella sorokiniana (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of Schomburgkia crispa (Orchidaceae)

Nathaskia Silva Pereira, Brenda Rodrigues Ramires Ferreira, Emerson Machado de Carvalho & Cláudia Roberta Damiani

Journal of Applied Phycology

ISSN 0921-8971

J Appl Phycol

DOI 10.1007/s10811-018-1441-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of *Schomburgkia crista* (Orchidaceae)

Nathaskia Silva Pereira¹ · Brenda Rodrigues Ramires Ferreira¹ · Emerson Machado de Carvalho¹ · Cláudia Roberta Damiani¹

Received: 27 November 2017 / Revised and accepted: 8 March 2018
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract

Schomburgkia crista Lindley (Orchidaceae) is an epiphytic species found in gallery forests and dry vegetation in the Brazilian Cerrado. It is typically unable to germinate or exhibits low germination because of dependency on mycorrhizal associations. In vitro cultivation techniques have helped circumvent difficulties involved in propagation from seeds. Alternative media and organic biostimulant substances that reduce costs and promote satisfactory in vitro growth are constantly sought. This study evaluated in vitro multiplication and rooting of *S. crista* in a modified culture medium containing extract of the microalga *Chlorella sorokiniana*. We analyzed supplementation of WPM (Woody Plant Medium) with microalgae suspended in NPK medium, or as the supernatant resulting from the centrifugation of a culture in NPK medium. The extracts were added to WPM instead of distilled water. The compounds 6-benzylaminopurine (BAP) and indolebutyric acid (IBA) were used as reference in the in vitro multiplication and rooting of *S. crista*, respectively. Both growth regulators were tested at 0, 2.5, and 5.0 mg L⁻¹. During in vitro multiplication of *S. crista*, WPM supplemented with 5.0 mg L⁻¹ BAP favored the formation of more sprouts, whereas WPM containing 2.5 mg L⁻¹ IBA supplemented with microalgae extract stimulated in vitro rooting. *Schomburgkia crista* explants cultivated in medium supplemented with microalgae suspension or the supernatant of *C. sorokiniana* showed growth similar to explants cultivated in WPM alone. Therefore, it is possible to use the microalga *C. sorokiniana* as a supplement and/or alternative to WPM for the in vitro cultivation of *S. crista*.

Keywords Micropropagation · Orchid · Microalgae · BAP · IBA

Introduction

Species belonging to the Orchidaceae family are commercially important because of the diversity in their size, flower shape, and color, beauty, durability, and in some species, medicinal and culinary properties (Faria et al. 2012). According

to Barros et al. (2016), there are 730 species in the Cerrado landscape of Brazil. Nevertheless, many members of the family, because of their substantial commercial value, are illegally and irrationally extracted from their natural habitat, resulting in destruction and in gradual loss of national biodiversity (Menezes 1985, 1987). One of the main native species is *Schomburgkia crista* Lindley, an epiphytic species present in gallery forests and as part of the dry vegetation of the Cerrado. According to the Biodiversitas Foundation (2007), it is on the list of endangered species in the Minas Gerais State, Brazil.

In general, there are only a few studies on the propagation and consequently the conservation of species belonging to the genus *Schomburgkia* (Dezan et al. 2012). In natural conditions, orchid propagation occurs asexually through the proliferation of adventitious or lateral buds, or by the dissemination of seeds which are formed in capsules (Pereira et al. 2011). According to these authors, low or null seed germination, as a

✉ Nathaskia Silva Pereira
nathaskia.spn@outlook.com

Brenda Rodrigues Ramires Ferreira
bmdramires@outlook.com

Emerson Machado de Carvalho
carvalho.em@gmail.com

Cláudia Roberta Damiani
claudiadamiani@ufgd.edu.br

¹ Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brazil

result of their dependency on mycorrhizal associations, hinders orchid propagation in the natural environment.

Considering the difficult propagation of orchids in natural conditions (Ramos and Carneiro 2007) and to reduce the predatory pressure on orchids, it is necessary to optimize their multiplication with the goals of preserving and reintroducing orchid populations in their native habitat. In vitro cultivation via micropropagation represents an alternative for the propagation of several species (Souza et al. 2007). Since 1975, it has been used in Brazil with the purpose of increasing seedling production, therefore contributing to the ex-situ conservation and reducing the risk of extinction of several species (Stancato et al. 2008). They also serve as models for the study of physiological aspects associated with plant growth and development (Ferreira and Suzuki 2008).

However, to achieve satisfactory germination and growth rates for in vitro cultivation, it is of paramount importance to establish the optimal growth conditions for each species, such as culture media and growth regulators. For instance, micropropagation is a technique that enables rapid and large-scale cultivation of new genotypes to obtain disease-free plants and seedlings of species that are difficult to propagate (Damiani and Schuch 2008). Growth regulators are important for micropropagation because they correct the insufficient endogenous levels of the explants, stimulating the responses required for cell differentiation, growth, elongation, and multiplication (Carvalho et al. 2006). However, growth regulators are extremely expensive, with 1 g of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) costing up to US\$115.00 and 1 g of the auxin indolebutyric acid (IBA) up to US\$15.00 (Sigma 2016). Furthermore, culture media commonly used such as MS (Murashige and Skoog 1962) and Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown 1980) contribute to the elevated production costs, because, on average, it costs between

US\$55.00 and US\$70.00 to produce 10 L of culture medium (Sigma 2016).

As part of an ongoing effort to reduce costs and substitute chemical compounds with biostimulant substances, alternative culture media are being tested as replacements of commercial formulations and synthetic growth regulators in their ability to promote plant development with the same physiological quality. In this context, microalgae represent a new option of alternative medium and/or supplement. Previous studies identified the presence of auxins, cytokinins, gibberellins, and brassinosteroids in microalgal strains (Stirk et al. 2013a, b), showing their biotechnological potential as supplements for in vitro cultivation of higher plants, because these hormones are essential to their development. In addition, because of their high productivity and thermoresistance, microalgae are able to synthesize a variety of lipids, polysaccharides, and other cellular products (Cazzaniga et al. 2014) required for plant development. Showing all the characteristics above, the microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) stands out for its elevated biotechnological potential (Bashan et al. 2016; Neofotis et al. 2016; Stirk et al. 2013a, b).

Considering this potential and the importance of studies on the micropropagation of the native plant species *S. crispera*, the objective of the present work was to evaluate *S. crispera* growth in the stage of in vitro multiplication and rooting in a medium supplemented with *C. sorokiniana*.

Material and methods

The experiments were conducted in the Laboratory of Plant Biotechnology in the Faculty of Biological and Environmental Sciences of the Federal University of Grande

Table 1 Analysis of variance summary for the in vitro multiplication of *Schomburgkia crispera*, cultured in WPM medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different BAP concentrations. LN leaf number, LL leaf length, RN root number, RL root length, SN shoot

number, SFW shoot fresh weight, RFW root fresh weight, SDW shoot dry weight, RDW root dry weight, SF source of variation, VC variation coefficient, DF degrees of freedom, OA overall average

SF	DF	Mean square									
		LN	LL	RN	RL	SN	SFW	RFW	SDW	RDW	
Medium	2	0.120 ^{ns}	0.387**	0.705 ^{ns}	0.355**	0.023 ^{ns}	122903**	6136 ^{ns}	2144**	22.86 ^{ns}	
Concentration	2	1.972**	0.095 ^{ns}	28.76**	6.480**	2.003**	46211*	898492**	1087**	7040**	
Medium × concentration	4	0.173 ^{ns}	0.118 ^{ns}	5.392*	0.820 ^{ns}	0.426 ^{ns}	9885 ^{ns}	61293**	92.95 ^{ns}	735.2**	
Residue	24	0.301	0.059	1.438	0.055	0.221	8817	2987	137	61.43	
VC (%)		12.3	31.1	37.3	28.1	32.8	30.5	25.1	25.7	35.5	
OA		4.5	0.8	3.2	0.8	1.4	308	218	45.5	22.1	

^{ns} non-significance, by the test *F*

*Significant at 5%, by the test *F*

**Significant at 1%, by the test *F*

Table 2 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different BAP concentrations on the plant shoot during the in vitro multiplication of *Schomburgkia crista*. BAP 6-benzylaminopurine, WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sis suspended microalgae, OA overall average

	Leaf number				Leaf length (cm)				Shoot number			
	BAP (mg L ⁻¹)				BAP (mg L ⁻¹)				BAP (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	4.9 ± 0.4Aa*	4.3 ± 0.4Aab	3.7 ± 0.4Aab	4.3 ± 0.6 ^A	0.7 ± 0.2Ba	0.6 ± 0.3Aa	0.7 ± 0.2ABa	0.7 ± 0.2 ^B	1.0 ± 0.1Ab	1.4 ± 0.5Aab	1.9 ± 0.3Aa	1.5 ± 0.5 ^A
WPM + Sup	4.9 ± 0.6Aa	4.2 ± 0.2Aa	4.4 ± 0.6Aa	4.5 ± 0.6 ^A	1.1 ± 0.1Aa	0.8 ± 0.5Aa	0.9 ± 0.3Aa	0.99 ± 0.3 ^A	1.0 ± 0Aa	1.7 ± 0.7Aa	1.4 ± 0.5Aa	1.4 ± 0.5 ^A
WPM + Sis	4.9 ± 0.8Aa	4.1 ± 0.5Aa	4.3 ± 0.4Aa	4.5 ± 0.7 ^A	0.7 ± 0.1ABa	0.7 ± 0.1Aa	0.4 ± 0.2Ba	0.7 ± 0.2 ^B	1.0 ± 0.1Ab	1.1 ± 0.2Ab	2.2 ± 0.9Aa	1.5 ± 0.7 ^A
OA	4.9 ± 0.6 ^a	4.3 ± 0.4 ^b	4.2 ± 0.5 ^b		0.9 ± 0.2 ^a	0.76 ± 0.3 ^a	0.7 ± 0.3 ^a		1.0 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.5 ^{ab}	1.85 ± 0.7 ^a	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

Dourados, Dourados—MS. Plant material consisted of *S. crista* seedlings previously established in vitro. Explants were represented by stem segments comprising two lateral buds and the apical bud at the multiplication stage, and four lateral buds and the apical bud at the rooting stage. Leaves were kept on the segment in both cases.

The *C. sorokiniana* strain originating from the André Tosello Foundation (Ref. 211–32) was cultivated in vitro in the laboratory of the Center for Research and Biodiversity (CPBio) of the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS). The cultivation was carried out using a synthetic nitrogen-phosphorous-potassium medium (NPK) (Carvalho et al. 2012) at concentrations of 90, 9.5, and 0.5% (v/v) of distilled water, NPK stock solution, and concentrated microalgae, respectively. The NPK stock solution was prepared with the addition of 0.70 g N/P/K (20-5-20) chemical fertilizer to 1.0 L distilled water (Sipaúba-Tavares and Rocha 2003). Cultures were kept in suspended plastic bags containing a total volume of 1.0 L, at room temperature, under ventilation, and subjected to a photoperiod of 12 h light at 27 μmol photons m⁻² s⁻¹.

We used a microalga density of 96 × 10⁵ cells mL⁻¹ (± 31), both as suspension in the culture medium (water and NPK) (Sus) and as supernatant (Sup) resulting from the centrifugation of the suspended microalgae for 5 min at 3200×g. These extracts were used as medium or to prepare WPM (Lloyd and McCown 1980) in substitution of water.

To evaluate the effect of the microalgae as supplement to WPM for in vitro cultivation of *S. crista*, two experiments were performed: in vitro multiplication, using the cytokine 6-benzylaminopurine (BAP) as reference, and in vitro rooting, with the auxin indolebutyric acid (IBA) as reference. In both cases, the growth regulators were tested at concentrations of 2.5 and 5.0 mg L⁻¹, in a total of nine treatments in each experiment, as follows: WPM + H₂O, WPM + H₂O + 2.5, WPM + H₂O + 5.0, WPM + Sus, WPM + Sus + 2.5, WPM + Sus + 5.0, WPM + Sup, WPM + Sup + 2.5, and WPM + Sup + 5.0.

Five treatments were tested in the evaluation of microalgae as an alternative to WPM: WPM + H₂O, WPM + Sup at a proportion of 10 and 90% (v/v), WPM + Sus at a proportion of 10 and 90% (v/v), and Sup and Sus.

The culture medium was prepared accordingly for each treatment, with 100 mg L⁻¹ myo-inositol and 30 g L⁻¹ sucrose added, except for the medium consisting only of microalgae supernatant and/or suspension. pH was adjusted to 5.8 before agar addition (6.0 g L⁻¹). The medium (30 mL) was distributed into 250-mL clear glass flasks, which were then closed with plastic lids. Sterilization was conducted in an autoclave at 121 °C/1.5 atm for 20 min.

Following explant preparation and inoculation, the flasks were transferred to a growth room at 25 ± 2 °C, photon flux density of 45 μmol photons m⁻² s⁻¹, and a photoperiod of 16 h light. All experiments were conducted in a completely

Table 3 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different BAP concentrations on the root system during the in vitro multiplication of *Schomburgkia crispera*. BAP 6-benzylaminopurine, WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae, OA overall average

	Root number				Root length (cm)			
	BAP (mg L ⁻¹)				BAP (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	5.1 ± 1.1Aba*	3.2 ± 0.9Aab	1.7 ± 1.5Ab	3.3 ± 1.8 ^A	1.8 ± 0.4Aa	0.6 ± 0.1ABb	0.4 ± 0.3Ab	0.90 ± 0.7 ^A
WPM + Sup	5.9 ± 1.0Aa	1.8 ± 1.3Ab	1.1 ± 1.3Ab	2.9 ± 2.4 ^A	1.6 ± 0.3Aa	0.2 ± 0.2Bb	0.2 ± 0.3Ab	0.64 ± 0.7 ^B
WPM + Sus	3.7 ± 1.6Ba	3.9 ± 1.0Aa	2.6 ± 0.6Aa	3.4 ± 1.2 ^A	1.7 ± 0.1Aa	0.8 ± 0.2Ab	0.5 ± Ab	0.96 ± 0.6 ^A
OA	4.9 ± 1.5 ^a	2.97 ± 1.3 ^b	1.8 ± 1.3 ^b		1.67 ± 0.3 ^a	0.5 ± 0.3 ^b	0.3 ± 0.3 ^b	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

randomized design, with four repetitions for every treatment, each consisting of one flask containing five explants.

At 60 days of cultivation, we evaluated the following parameters: number of leaves (NL), leaf length in centimeters (LL), number of roots (NR), bud length in centimeters (BL), shoot fresh weight in milligrams (SFW), shoot dry weight in milligrams (SDW), root fresh weight in milligrams (RFW), and root dry weight in milligrams (RDW).

Statistical analyses were performed using the software Winstat (Machado and Conceição 2002). Data were subjected to an analysis of variance, and the average of the treatments was compared using the Tukey's test or Duncan's multiple range test at a 5% significance level.

Results

In vitro multiplication in medium supplemented with *C. sorokiniana*

In general, at the in vitro multiplication stage of *S. crispera*, the evaluated parameters had a significant effect ($p < 0.5$). According to the analysis of variance (Table 1), culture medium showed a significant effect (at 5% significance level) on leaf and root length and on shoot fresh and dry weight. The addition of 6-benzylaminopurine (BAP) had a significant influence (at 1 and 5% significance level) for most of the evaluated variables. A significant interaction between those two

Table 4 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different BAP concentrations on the plant fresh and dry weight during the in vitro multiplication of *Schomburgkia crispera*.

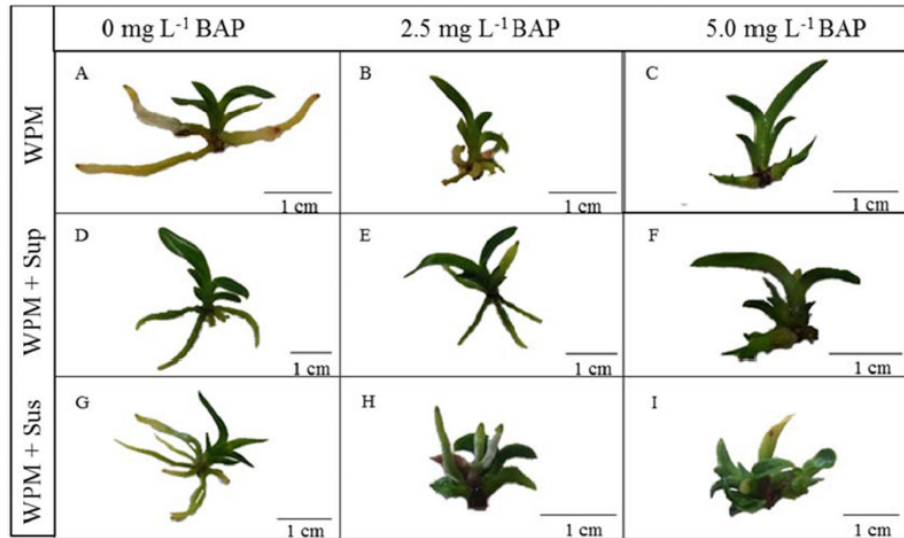
BAP 6-benzylaminopurine, WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae, OA overall average

	Shoot fresh weight				Root fresh weight			
	BAP (mg L ⁻¹)				BAP (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	200 ± 39Bb*	216 ± 91Bb	383 ± 45Aa	266 ± 103 ^B	557 ± 64Ba	134 ± 91Ab	7.0 ± 7Ac	233 ± 252 ^A
WPM + Sup	404 ± 56Aa	416 ± 162Aa	450 ± 148Aa	423 ± 152 ^A	647 ± 90Aa	9.0 ± 9Bb	3.0 ± 6Ab	228 ± 352 ^A
WPM + Sus	246 ± 63ABb	153 ± 20Bb	302 ± 96Aa	234 ± 114 ^B	361 ± 13Ca	156 ± 63Ab	58 ± 12Ac	192 ± 136 ^A
OA	283 ± 103 ^{ab}	262 ± 152 ^b	378 ± 114 ^a		530 ± 147 ^a	100 ± 89 ^b	23 ± 27 ^c	
	Shoot dry weight				Root dry weight			
WPM	31 ± 1Bb	36 ± 12Bb	58 ± 7ABa	42 ± 14 ^B	52 ± 4.4Aa	16 ± 9.9Ab	2.0 ± 1.2Aa	23 ± 23 ^A
WPM + Sup	53 ± 6Aa	58 ± 21Aa	68 ± 15Aa	60 ± 15 ^A	63 ± 17.6Aa	1.0 ± 1.7Bb	0.5 ± 0.9Ab	21 ± 32 ^A
WPM + Sus	31 ± 8Ba	28 ± 3Ba	42 ± 14Ba	34 ± 10 ^B	32 ± 3.6Ba	21 ± 8.8Aab	8 ± 1.8Ab	20 ± 11 ^A
OA	38 ± 12 ^b	48 ± 19 ^b	56 ± 16 ^a		49.5 ± 17 ^a	13 ± 11 ^b	3.6 ± 3.9 ^c	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

Fig. 1 General appearance of *Schomburgkia crista* seedlings, cultivated in WPM (Wood Plant Medium) supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different 6-benzylaminopurine (BAP) concentrations, at 60 days of in vitro culture. *Sup* supernatant, *Sus* suspended microalgae



parameters was observed for the number of roots and root fresh and dry weight.

Explants cultivated with in the presence of BAP presented a higher number of buds but, however, presented short and less numerous leaves. Medium formulation had no significant effect on the number of leaves, whereas leaves were longer on WPM supplemented with *C. sorokiniana* (Table 2).

Regarding root development during the multiplication stage, there were more explants cultivated in the medium supplemented with microalgae supernatant presented higher average number of roots (Table 3).

Cultivation on WPM with 5.0 mg L⁻¹ BAP added and supplemented with supernatant promoted shoot growth, with an increased biomass production, both fresh and dry (Table 4).

Concerning root fresh and dry weight, we observed that explants cultivated on WPM in the absence of regulator and

supplemented with microalgae supernatant resulted in greater biomass, with a direct correlation with the values observed for number of roots and root length (Table 4).

With regard to the general aspect of the seedlings after 60 days of cultivation (Fig. 1), the explants cultivated on WPM medium supplemented with microalgae, both in suspension or as supernatant, showed more pigmented (green) roots, regardless of regulator addition.

In vitro rooting on medium supplemented with *C. sorokiniana*

At the second stage, the in vitro rooting of *S. crista*, the analysis of variance showed a significant effect of culture medium and the concentration of indolebutyric acid (IBA), as well as an interaction between these two factors. Culture

Table 5 Analysis of variance summary for the in vitro rooting of *Schomburgkia crista*, cultured in WPM medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different IBA concentrations. *LN* leaf number, *LL* leaf length, *RN* root number, *RL* root length, *SN* shoot

number, *SFW* shoot fresh weight, *RFW* root fresh weight, *SDW* shoot dry weight, *RDW* root dry weight, *SF* source of variation, *VC* variation coefficient, *DF* degrees of freedom, *OA* overall average

SV	DF	Mean square								
		LN	LL	RN	RL	SN	SFW	RFW	SDW	RDW
Medium	2	1.76*	3.20**	19.80**	0.44**	0.18*	20,620 ^{ns}	193,398 ^{ns}	895.72 ^{ns}	1047 ^{ns}
Concentration	2	0.84 ^{ns}	0.81**	2.85 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.14*	39,068 ^{ns}	579,159**	617 ^{ns}	4273**
Medium × concentration	4	0.73 ^{ns}	0.45**	1.94 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.21**	20,791 ^{ns}	257,268*	400.1 ^{ns}	2587.9**
Residue	24	0.32	0.06	0.86	0.07	0.03	11,832	69,709	410.3	566.4
VC (%)		12.5	16.4	21.4	21.4	17.0	26.6	38.4	31.7	36.3
OA		4.5	1.4	4.3	1.2	1.1	408.3	686.8	63.8	65.5

^{ns} non-significance, by the test F

*Significant at 5%, by the test F

**Significant at 1%, by the test F

medium affected number and length of roots and leaves and the number of buds, whereas IBA at different concentrations had a significant effect on leaf length, number of buds, and root fresh and dry weight. The interaction between these two factors during the in vitro rooting affected leaf length, number of buds, and root fresh and dry weight (Table 5).

Explants cultivated on WPM containing 5.0 mg L⁻¹ IBA and supplemented with the microalgae supernatant developed more leaves (4.9), whereas those cultivated on WPM with 5.0 mg L⁻¹ IBA added and supplemented with the microalgae suspension exhibited a higher average value for leaf length (2.5 mm) (Table 6).

Regarding number and root length, we observed that explants cultivated on medium with IBA, regardless of regulator concentration (2.5 or 5.0 mg L⁻¹), exhibited a higher average value. Concerning culture medium composition, explants grown on medium supplemented with the microalgae suspension showed a higher number of roots (5.8) (Tables 7 and 8).

Explants cultivated on WPM medium with 2.5 mg L⁻¹ IBA added and supplemented with microalgae suspension presented higher values for fresh and dry weight of shoots and roots when compared to the values observed in the other treatments (Table 7). With regard to the general appearance of the seedlings at the rooting stage after 60 days of cultivation (Fig. 2), the explants cultivated on WPM and on WPM supplemented with microalgae suspension presented more developed roots.

Microalgae extract as culture medium

ANOVA indicated that the treatments with different culture medium compositions had significant effects on the average number of roots and on the root dry weight (Table 9). For the other variables, there were no significant differences between treatments. Regardless of formulation, the culture medium did not have any effect on the average number and length of leaves per explant (2.2 and 0.7, respectively) (Fig. 3a), according to the pairwise comparison tests.

There was a significant difference between treatments in the average number of leaves (Fig. 3b). Explants grown on WPM and on WPM supplemented with microalgae supernatant had more roots in comparison with the explants cultivated on WPM supplemented only with microalgae suspension. The root length and the average number of buds (Fig. 3a) were not significantly different among treatments. Concerning shoot fresh and dry weight and root fresh weight (Fig. 4), root dry weight was highly affected by culture medium composition. Explants cultivated on WPM and on WPM supplemented with the microalgae suspension had higher dry weight.

With regard to the general aspect of the seedlings (Fig. 5), we observed that the explants grown on WPM and on WPM supplemented with microalgae, both as supernatant and in suspension, developed roots that were longer and less thick. On medium containing only microalgae supernatant or

Table 6 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different indolebutyric acid (IBA) concentrations during the in vitro rooting of *Schomburgkia crispa*. WPM Wood Plant Medium, *Sip* supernatant, *Sus* suspended microalgae, OA overall average

	Leaf number				Leaf length (cm)				Shoot number			
	IBA (mg L ⁻¹)				IBA (mg L ⁻¹)				IBA (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	4.6 ± 0.4Aa*	4.5 ± 0.4Aa	4.8 ± 0.6ABa	4.6 ± 0.5 ^A	0.9 ± 0.3Ba	1.1 ± 0.2Ba	1.2 ± 0.1Ba	1.06 ± 0.2 ^B	1.7 ± 0.5Aa	1.1 ± 0.1Ab	1.0 ± 0Ab	1.2 ± 0.4 ^A
WPM + Sup	4.6 ± 0.4Aa	4.8 ± 0.4Aa	4.9 ± 0.5Aa	4.8 ± 0.4 ^A	1.2 ± 0.2ABa	1.3 ± 0.4Ba	1.1 ± 0Ba	1.21 ± 0.3 ^B	1.0 ± 0Ba	1.0 ± 0Aa	1.2 ± 0.2Aa	1.1 ± 0.1 ^{AB}
WPM + Sus	3.4 ± 1.0Bb	4.9 ± 0.5Aa	3.9 ± 0.4Bb	4.0 ± 0.9 ^B	1.3 ± 0.2Ab	2.5 ± 0.3Aa	2.3 ± 0.1Aa	2.02 ± 0.6 ^A	1.0 ± 0Ba	1.0 ± 0Aa	1.0 ± 0Aa	1.0 ± 0 ^B
OA	4.2 ± 0.8 ^a	4.7 ± 0.4 ^a	4.5 ± 0.7 ^a	4.5 ± 0.7 ^a	1.1 ± 0.3 ^b	1.6 ± 0.7 ^a	1.5 ± 0.6 ^a		1.2 ± 0.4 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	1.1 ± 0.1 ^{ab}	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

Table 7 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different indolebutyric acid (IBA) concentrations during the in vitro rooting of *Schomburgkia crispera*. WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae, OA overall average

	Root number				Root length (cm)			
	IBA (mg L ⁻¹)				IBA (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	2.8 ± 1.4Aa*	3.7 ± 0.2Ba	3.4 ± 0.6Ba	3.3 ± 0.9 ^B	1.0 ± 0.4ABb	1.3 ± 0.3Aab	1.7 ± 0.5Aa	1.3 ± 0.5 ^A
WPM + Sup	4.2 ± 0.9Aa	4.2 ± 0.6Ba	3.4 ± 0.8Ba	3.9 ± 0.8 ^B	1.4 ± 0.2Aa	1.3 ± 0.1Aa	1.4 ± 0.2ABa	1.3 ± 0.2 ^A
WPM + Sus	4.5 ± 1.2Aa	6.5 ± 1.5Aa	6.3 ± 0.7Aa	5.8 ± 1.4 ^A	0.9 ± 0Ba	1.1 ± 0.3Aa	1.0 ± 0.1Ba	1.0 ± 0.2 ^B
OA	3.8 ± 1.3 ^b	4.8 ± 1.6 ^a	4.4 ± 1.6 ^{ab}		1.1 ± 0.3 ^b	1.3 ± 0.2 ^{ab}	1.3 ± 0.4 ^a	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

suspension, roots were shorter and thicker. In addition, explants cultivated on WPM supplemented with microalgae supernatant had a higher number of internodes, more pigmented leaves, and a thicker leaf lamina.

Discussion

The cytokinins play an important role in the micropropagation, directly affecting foliar expansion, apical dominance breakage, and the formation of adventitious buds (Del Pozo et al. 2005). In the present work, the effects of cytokinins on foliar expansion were not observed. Nevertheless, there was a significant increase in the number of buds on explants cultivated on

medium containing BAP, especially at the concentration of 5.0 mg L⁻¹.

In general, the formation of new buds led to a reduction in the foliar growth, as well as in the number of leaves. The reduced foliar growth may be explained by the fact that the development of a new bud acts as drainage, deviating photoassimilates that otherwise could have been invested in foliar expansion. On the other hand, increasing the number of buds should simultaneously result in an increased amount of leaves. However, in this case, it is important to note that all formed protocorms were regarded as buds, regardless of development stage and the presence of leaves.

For the multiplication of *S. crispera* with the purpose of increasing the number of buds, it is recommended to use WPM with 5.0 mg L⁻¹ BAP added, because the higher the number of

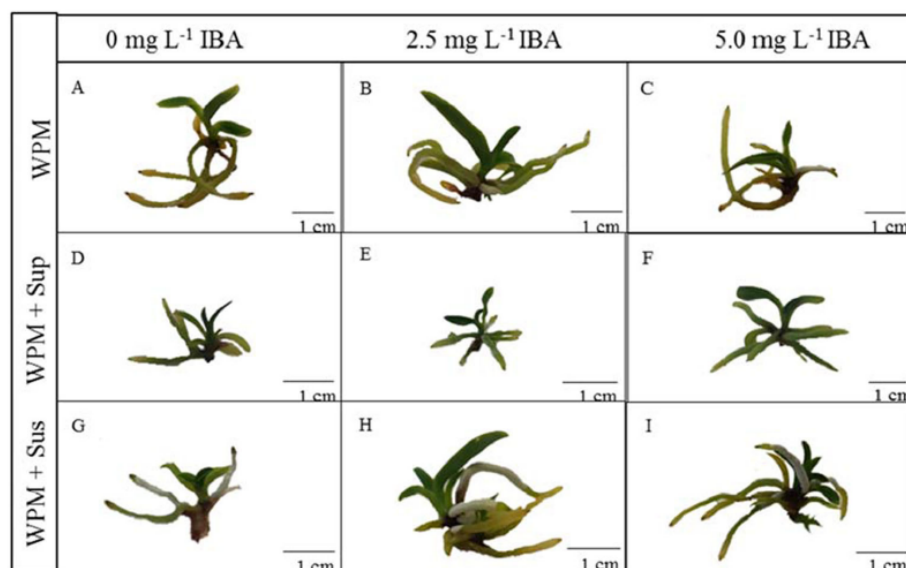
Table 8 Effect of culture medium supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different indolebutyric acid (IBA) concentrations during the in vitro rooting of *Schomburgkia crispera*. WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae, OA overall average

	Shoot fresh weight				Root fresh weight			
	IBA (mg L ⁻¹)				IBA (mg L ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	OA	0	2.5	5.0	OA
WPM	350 ± 25Aa	337 ± 14Ba	434 ± 148Aa	374 ± 91 ^A	366 ± 235Aa	667 ± 288Aa	823 ± 476ABa	619 ± 372 ^A
WPM + Sup	368 ± 173Aa	406 ± 78ABa	414 ± 184Aa	396 ± 140 ^A	630 ± 403Aa	684 ± 62Aa	508 ± 107Ba	607 ± 233 ^A
WPM + Sus	310 ± 57Ab	560 ± 106Aa	493 ± 90Aab	454 ± 135 ^A	303 ± 197Ab	1123 ± 186Aa	1073 ± 128Aa	833 ± 422 ^A
OA	342 ± 99 ^a	434 ± 119 ^a	447 ± 136 ^a		433 ± 303 ^b	825 ± 286 ^a	801 ± 357 ^a	
	Shoot dry weight				Root dry weight			
WPM	53 ± 6.8Aa	53 ± 3.5Ba	66 ± 25Aa	58 ± 15 ^A	40 ± 26Ab	58 ± 22Aab	92 ± 39Aa	64 ± 35 ^A
WPM + Sup	56 ± 21Aa	58 ± 13ABa	64 ± 36Aa	59 ± 23 ^A	60 ± 34Aa	64 ± 11Aa	45 ± 6.6Ba	56 ± 21 ^A
WPM + Sus	56 ± 17Aa	90 ± 22Aa	74 ± 13Aa	73 ± 21 ^A	30 ± 22Ab	100 ± 8.2Aa	96 ± 12Aa	75 ± 36 ^A
OA	55 ± 14 ^a	67 ± 21 ^a	68 ± 24 ^a		43 ± 28 ^b	74 ± 25 ^a	78 ± 32 ^a	

Means followed by the same capital letters in a column and small letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ($p < 0.05$)

*Values are means ± standard deviation determined from four replicates each

Fig. 2 General appearance of *Schomburgkia crispa* seedlings, cultivated in WPM (Wood Plant Medium) supplemented with *Chlorella sorokiniana* and different indolebutyric acid (IBA) concentrations, at 60 days of in vitro culture. *Sup* supernatant, *Sus* suspended microalgae



buds formed, the higher the percentage of clones (seedlings) produced.

In the preparation of the buds for rooting, we recommend that they are transferred to WPM supplemented with microalgae supernatant in the absence of growth regulator. This is because this was the treatment that resulted in the seedlings with most vigor and the highest biomass production, as well as the greater foliar growth and consequently a larger area able to undergo photosynthesis, therefore improving the physiological quality of the plant, which will be better prepared for the rooting stage and the change from a mixotrophic to an autotrophic state.

It is important to consider that the main purpose of in vitro multiplication is to produce the highest number of genetically uniform propagules with potential to develop roots in the subsequent stage (Canhoto 2010). Based on the present work, because root production by *S. crispa* already occurred in the multiplication stage, one could eliminate the subsequent stage

(rooting), considering that the developed seedling would already be ready for the acclimation process. In vitro rooting is extremely important economically, as well as for the conservation and preservation of the species, because it significantly increases seedling survival rate in the transition to the acclimation stage.

Nevertheless, it should be noted that the goal of micropropagation in most cases is the production of seedlings at a large scale. Thus, direct rooting during multiplication may considerably impair large-scale production. Another limitation of simultaneous multiplication and rooting is that, in this case, photoassimilates will have to be shared between roots and shoots, consequently reducing bud number and mass.

Root production and growth depend on the presence of auxins, whereas formation and growth of adventitious buds are regulated by cytokinins (Taiz and Zeiger 2009), and both processes are regulated by the endogenous balance auxin/cytokinins. Although increasing this ratio promotes root

Table 9 Analysis of variance summary for the in vitro micropropagation of *Schomburgkia crispa*, cultured in medium formulated and/or supplemented with *Chlorella sorokiniana*. *LN* leaf

number, *LL* leaf length, *RN* root number, *RL* root length, *SN* shoot number, *SFW* shoot fresh weight, *RFW* root fresh weight, *SDW* shoot dry weight, *RDW* root dry weight

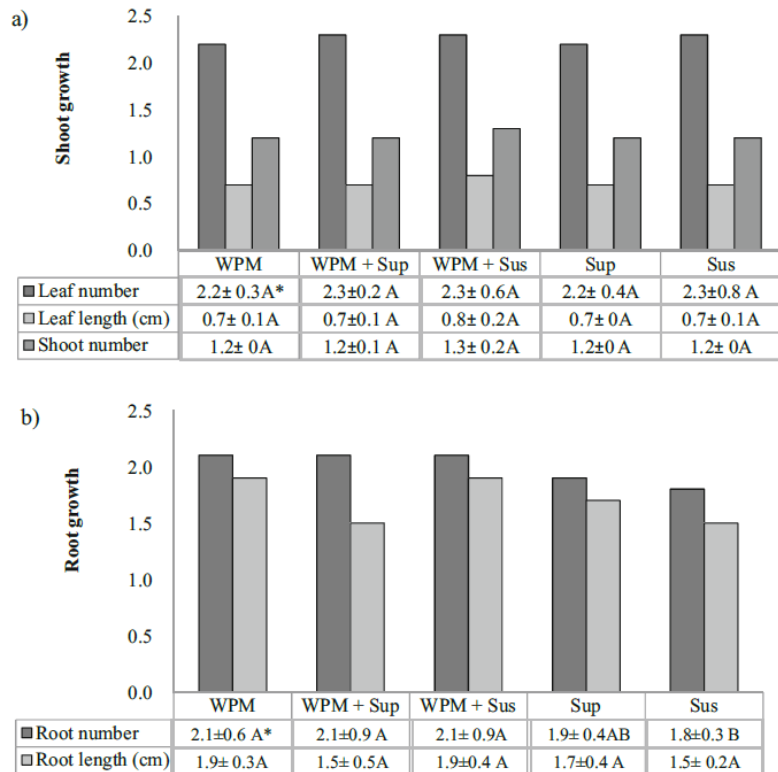
Source of variation	Degrees of freedom	Mean square									
		LN	LL	RN	RL	SN	MFW	RFW	SDW	RDW	
Medium	4	0.014 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.066*	0.126 ^{ns}	0.001 ^{ns}	4279.4 ^{ns}	44.462 ^{ns}	100.7 ^{ns}	786.6**	
Residue	12	0.012	0.012	0.019	0.137	0.001	5999.1	24,895.7	86.5	139.9	
Variation coefficient (%)		4.9	15.7	6.9	22.0	3.2	27.5	35.4	27.0	32.2	
Overall average		2.2	0.7	2.0	1.7	1.2	281.4	446	34.4	36.8	

^{ns} non-significance, by the test F

*Significant at 5%, by the test F

**Significant at 1%, by the test F

Fig. 3 Effect of *Chlorella sorokiniana* as a supplement to the WPM medium and/or medium **a** in the shoot growth and **b** in the root growth during the in vitro micropropagation of *Schomburgkia crista*. WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae. *Values are means \pm standard deviation determined from four replicates each. *Means followed by equal letters in the line do not differ from one another by the Duncan test at 5% error probability



formation, reducing it leads to bud production. Our results clearly indicated that the presence of IBA in the culture medium increased the auxin/cytokine ratio, especially when the medium was supplemented with the microalgae suspension, resulting in the formation of a higher number of roots. In the presence of BAP, that ratio increased, promoting the development of a higher number of buds.

Our results are pivotal considering the scarceness of studies on *S. crista* and on the technique we used for the

multiplication of this microalga. In one of the existing works, Souza et al. (2007) analyzed microbial contamination of in vitro propagation, and in another, de Souza et al. (2014) evaluated the effect of antioxidants and the absence of light on in vitro development of *S. crista*. However, it is not possible to compare their results with ours, because the parameters and variables evaluated were different.

The use of the microalga *C. sorokiniana* alone as supernatant or in suspension promoted the growth of *S. crista*

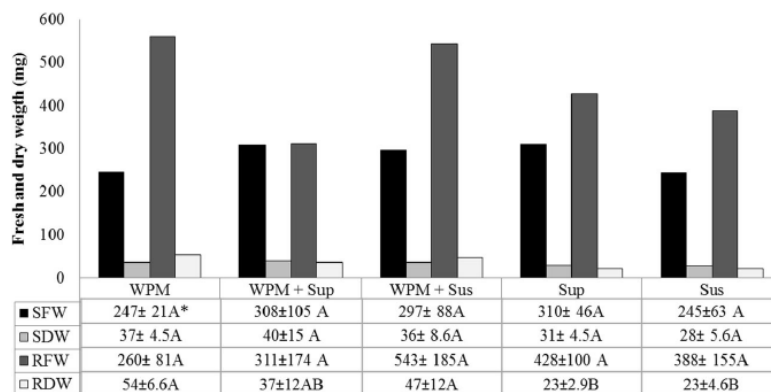


Fig. 4 Effect of *Chlorella sorokiniana* as a supplement to the WPM medium and/or medium during the in vitro micropropagation of *Schomburgkia crista*. WPM Wood Plant Medium, Sup supernatant, Sus suspended microalgae, SFW shoot fresh weight, RFW root fresh

weight, SDW shoot dry weight, RDW root dry weight. *Values are means \pm standard deviation determined from four replicates each. *Means followed by equal letters in the line do not differ from one another by the Duncan test at 5% error probability

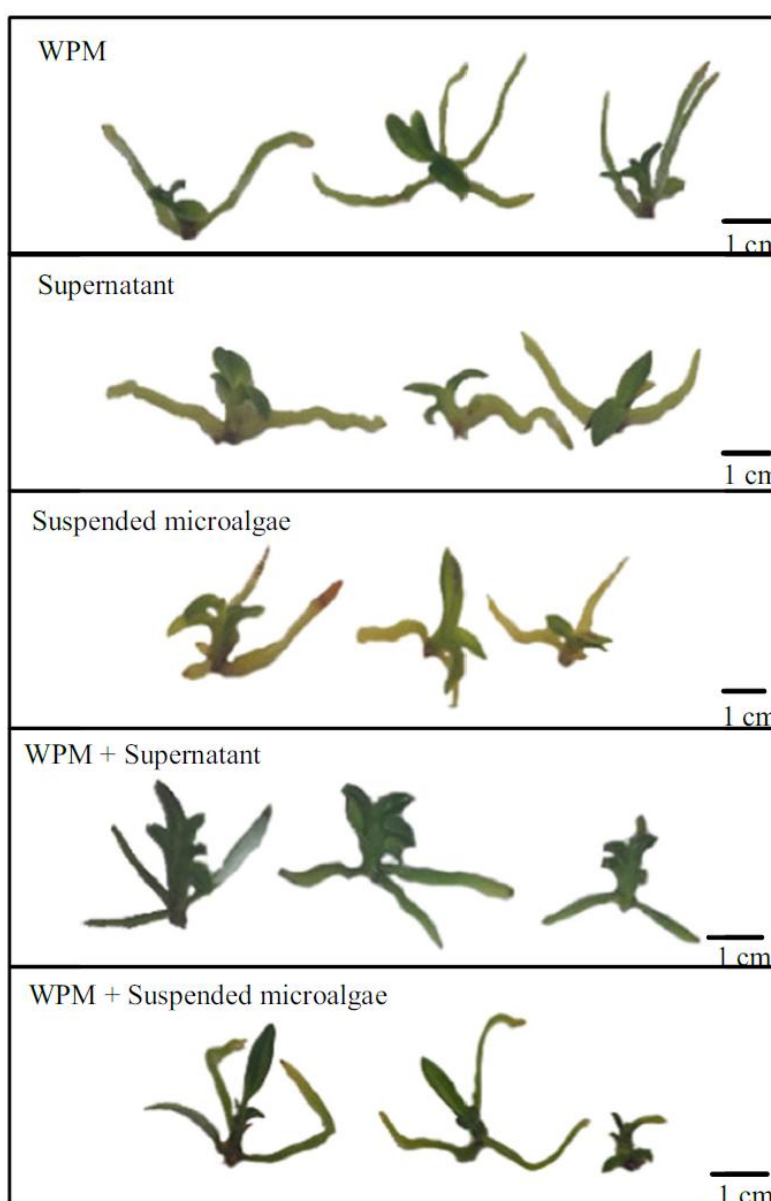
explants similarly to the explants cultivated on WPM for most of the variables evaluated, except for the number of roots and root fresh and dry weight.

Microalgae are rich in micro and macronutrients. According to Henrikson (2009), species of the genus *Chlorella* are composed of 60% proteins, 18% carbohydrates, 10% lipids, 7% minerals (such as calcium, iron, magnesium, sodium, potassium, phosphorus, and zinc), 5% moisture, and 1 g of vitamins, such as beta-carotene, vitamin C, vitamin E, vitamin B6, vitamin B12, thiamin (B1), riboflavin (B2), and nicotinic acid (B3). Besides vitamins, Mostafa (2012) detected the presence of amino acids and polypeptides essential for

the in vitro development of higher plants in the microalgae. It is relevant to point out that the microalgae could also promote plant growth by synthesizing secondary metabolites with hormonal activities. Such metabolites exhibit biological activity similar to the phytohormones produced by higher plants and the growth regulators commonly added to culture media. Accordingly, previous studies confirmed the presence of auxins, cytokinins, gibberellins, and brassinosteroids in microalgae (Mazur et al. 2001; Stirk et al. 2013a, b).

Previous works also showed positive results when microalgae were used as a supplement to the culture media for the in vitro growth of higher plants. In an experiment

Fig. 5 General appearance of *Schomburgkia crista* seedlings, cultivated with *Chlorella sorokiniana* as a supplement to the WPM medium and/or medium



similar to ours, Molnár and Ördög (2005) centrifuged cultures of microalgae and cyanobacteria and used the supernatant instead of distilled water to dilute stock solutions of B5 medium in the cultivation of peas (*Pisum sativum* L.), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), and beetroot (*Beta vulgaris* L.). These same authors observed that the supernatants of *Chlorococcum ellipsoideum* and *Selenastrum rinoi* cultures consist of a satisfactory supplement in the culture of rot beet buds, alone or combined with BAP and NAA (naphthalene acetic acid), promoting the development of more vigorous buds, and may even induce rooting. In orchid species belonging to the genera *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum*, and *Oncidium*, Virág et al. (2011) evaluated the use of different microalgae (*Oocystis* sp., *Scotiella* sp., *Scenedesmus* sp., *Tetracyctis* sp., and *Nostoc*) and observed that their effect on in vitro culture medium depended both on the microalga and the orchid. In *Phalaenopsis* and *Paphiopedilum*, the culture medium supplemented with the biomasses of five microalga species at a concentration of 0.5 g L⁻¹ promoted plant development. In *Oncidium*, supplementation with *Nostoc* (cyanobacteria) extract at higher concentrations (0.5–1.0 g L⁻¹) had a beneficial effect on plant growth.

Studies conducted by Jäger et al. (2010) on maize (*Zea mays* L.) showed that the addition of cyanobacteria and microalgae biomass to the induction and regeneration media at concentrations 1.0 or 2.0 g L⁻¹ stimulated the androgenic response and was able to reduce and/or entirely substitute for the use of a synthetic auxin (2.4D) commonly added to the cultivation medium.

Considering that for most of the evaluated parameters, there were no significant differences between the observed averages in each of the culture medium tested, we assume that, for the in vitro cultivation of *S. crispa*, the commercial culture medium WPM can be substituted with an alternative formulated with the microalga *C. sorokiniana*, either as supernatant or in suspension. However, it is recommended to use the microalgae in suspension as the alternative medium, because a centrifuge is required for supernatant production, increasing the costs of plantlet production on a commercial scale.

Conclusion

For the multiplication of *S. crispa* with the purpose of producing the highest number of buds, we recommend the use of WPM containing 5.0 mg L⁻¹ BAP. For better shoot development with more fresh weight, we recommend the use of WPM with 5.0 mg L⁻¹ BAP supplemented with *C. sorokiniana* supernatant. For the preparation of buds for the rooting stage, it is recommended to transfer them to WPM supplemented with *C. sorokiniana* supernatant in the absence of growth regulator. For the in vitro rooting of *S. crispa*, we suggest using WPM

with 2.5 mg L⁻¹ IBA supplemented with microalgae in suspension.

In vitro cultivation in medium containing the microalga *C. sorokiniana* both in suspension and as supernatant promoted *S. crispa* growth. In vitro cultivation of *S. crispa* may be conducted on an alternative medium formulated with *C. sorokiniana* either in suspension or as supernatant, which can substitute for WPM without any loss in the quality of the produced plantlets.

Acknowledgements The authors acknowledge the scholarships provided and financial support by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS).

References

- De Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO, Guimarães LRS (2016) Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB69703>; searched on 10 August 2017
- Bashan Y, Lopez BR, Huss VAR, Amavizca E, de-Bashan LE (2016) *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. J Appl Phycol 28:113–121
- Canhoto JM (2010) Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, p 407
- Carvalho EM, Ottonelli F, Ansilago M, Godoy HC, Nakagaki JM, Ramires I (2012) Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. Biochem Biotechnol Rep 1:14–18
- Carvalho JMFC, Pimentel NW, Aires PSR, Pimentel LW (2006) Considerações Gerais Sobre Organogênese. Documentos 150, Embrapa Algodão, Campina Grande. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18322/1/DOC150.pdf>; searched on 10 August 2017
- Cazzaniga S, Dall'Osto L, Szaub J, Scibilia L, Ballottari M, Purton S, Bassi R (2014) Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. Biotechnol Biofuel 7:157
- Damiani CR, Schuch MW (2008) Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. Rev Bras Frutic 30:482–487
- de Souza APR, da Silva SR, Sorgato JC, Soares JS, Rosa YBCJ (2014) Antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento *in vitro* de *Schomburgkia crispa* Lindl. Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer 10(18):333
- Dezan LF, Canassa F, Souza-Leal T, Diogo JA, Massaro R, Cordeiro GM, Pedroso de Moraes C (2012) Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. Idesia 30:53–58
- Faria RT, Assis AM, Unemoto LK, Carvalho JFRP (2012) Produção de Orquídeas em Laboratório. Macenas, Londrina
- Ferreira WM, Suzuki RM (2008) O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Loiola MIB, Baseia IG, Lichston JE (eds) Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil. Imagem Gráfica, Natal, pp 67–68

- Biodiversitas Foundation (2007) Lista das espécies presumivelmente ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/relatoriolistasmg_vol2.pdf; searched on 10 August 2017
- Henrikson R (2009) Earth Food *Spirulina* How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet. <http://www.spirulinasource.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>
- Jäger K, Bartók T, Ördög V, Barnabás B (2010) Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *S Afr J Bot* 76:511–516
- Lloyd GE, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proc Internat Plant Propagat Soc* 30:421–427
- Machado AA, Conceição AR (2002) WinStat, sistema para análise estatística para Windows. Versão 2.0. Pelotas, UFPel/NIA
- Mazur H, Konop A, Synak R (2001) Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J Appl Phycol* 13:35–42
- Menezes LC (1987) *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas Brasileiras. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro
- Menezes LC (1985) *Laelia purpurata*. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro
- Molnár Z, Ördög V (2005) Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). *Acta Biol Szeged* 49:39–40
- Mostafa SSM (2012) Microalgal biotechnology: prospects and applications. In: Nabin Kumar D (ed) *Intech, Riejeka*, pp 275–314. Available online: <http://www.intechopen.com/books/plant-science/microalgal-biotechnology-prospects-and-applications>. Accessed 1 Aug 2017
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Neofotis P, Huang A, Ki S, Chang W, Joseph F, Gabr A, Twary S, Qiu W, Holguin O, Polle JEW (2016) Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Res* 15:164–178
- Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL, Kasuya MCM (2011) Geminação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Bot Bras* 25(3): 534–541
- Del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Biol Plant* 123:173–183
- Ramos TV, Carneiro IF (2007) Multiplicação “in vitro” de *Cattleya x mesquítae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesq Agropec Trop* 37:10–15
- Sigma (2016) <http://www.sigmaaldrich.com>; searched on 03 de Março de 2016
- Sipaúba-Tavares LH, Rocha O (2003) Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. RIMA, São Carlos, p 106
- Souza GC, Campos MRC, Clemente PL (2007) Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. *Rev Brasil Biociênc* 5:405–407
- Stancato GC, Abreu MF, Furlani AMC (2008) Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia* 67(1):51–57
- Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, Novák O, Strnad M, Ördög V, van Staden J (2013b) Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiol Biochem* 70:348–353
- Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Bálint P, van Staden J (2013a) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J Phycol* 49:459–467
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. Translation: Santarém ER [et al.], 4th edn, Artmed, Porto Alegre, 848p
- Virág E, Molnár Z, Ördög V (2011) Application of algal biomass for enhanced acclimatization of orchids. *Acta Biol Szeged* 55:179–181