



POTENCIALIZAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla phaeantha* Rchb.f. COM USO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

ENHANCEMENT OF *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Vanilla phaeantha* Rchb.f. USING TEMPORARY IMMERSION BIOREACTORS

Mariana Oliveira Medeiros^{1*}; Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso²; Frederico Henrique da Silva Costa³; Rennan Oliveira Meira⁴; André Luís Xavier de Souza⁵; Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁵.

¹Bolsista. Funarbe/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. mariana.om17@hotmail.com;

²Pós-doutoranda. Funarbe/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. inaemarie@hotmail.com;

³Pós-doutorando. Professor da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil. frederico.costa@ufac.br;

⁴Pós-doutorando. FapDF/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. rennan.meira@hotmail.com;

⁵Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. andre.luis@embrapa.br; jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A baunilha é uma planta do gênero *Vanilla*, pertencente à família Orchidaceae. O gênero composto por mais de 120 espécies, algumas extintas e outras em situação de perigo por causa da destruição de seus habitats naturais e manejo inadequado, especialmente nas regiões tropicais das Américas (DIVAKARAN; BABU; PETER, 2006; IUCN, 2022; POWO, 2023). O fruto da baunilha é de grande importância econômica, visto que produz a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), composto orgânico muito utilizado na gastronomia, indústrias farmacêuticas, alimentícia, de cosméticos e tabacaria, com o objetivo de intensificar aromas e sabores (HOMMA et al., 2006; LEE-ESPINOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; FERRARA, 2019; BRAMEL; FREY, 2021).

Apesar do Brasil apresentar condições favoráveis para o cultivo da baunilha, a produção é baixa e dispendiosa com as técnicas de propagação convencionais. Normalmente, a baunilha é propagada por meio de estaquia, mas esse método é oneroso e pode gerar prejuízo à planta matriz, além de ser lento e, geralmente, não suprir a demanda comercial (GANTAIT; KUNDU, 2017). A micropropagação pode gerar uma produção em larga escala de mudas, utilizando uma pequena quantidade de material, a partir de tecidos e órgãos de plantas matrizes, mantendo a identidade genética do material propagado (MENEZES et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2017). Algumas estratégias são estudadas e utilizadas com objetivo de potencializar os resultados da micropropagação, como o cultivo em biorreatores com sistema de imersão temporária (RAMOS-CASTELLÁ et al., 2014; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016).

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo desenvolver protocolo para produção em larga escala de baunilha (*Vanilla phaeantha*) pela utilização de biorreatores de imersão temporária.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram testados três modelos diferentes de biorreatores de imersão temporária, RITA® (1 L), RALM® (5 L) e BIT® (5 L) (Figura 1), sobre a multiplicação *in vitro* de brotações do acesso LBB de *Vanilla phaeantha* Rchb.f.

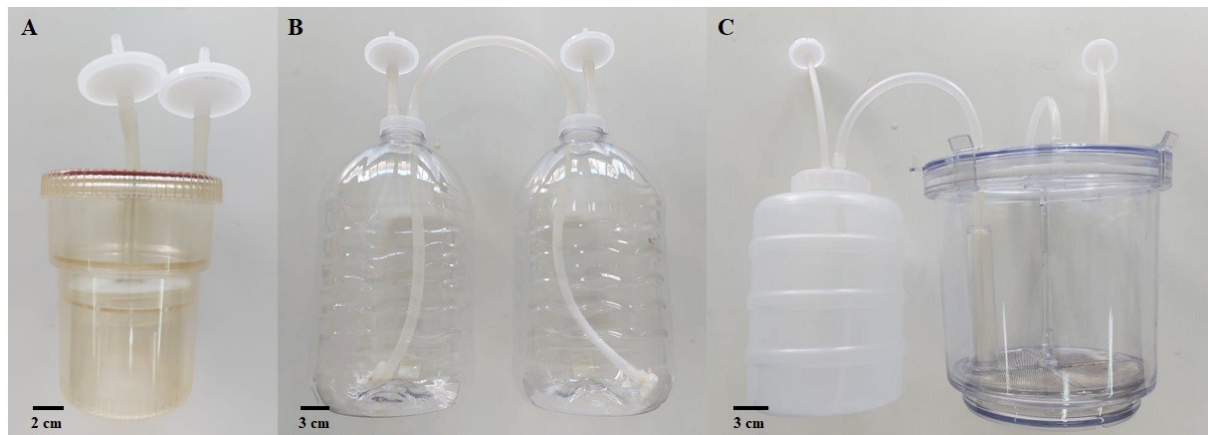


FIGURA 1. Modelos de biorreatores de imersão temporária utilizados no experimento. A - RITA®. B - BIT®. C - RALM®. Escalas: A – 2 cm. B e C – 3 cm.

Foram utilizados explantes de porções caulinares (nodais) de cerca 1,0 cm de altura, com uma gema axilar. O meio utilizado foi o básico de MS, com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2 mg L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP). Para o modelo RITA®, foram utilizados 180 mL de meio líquido para 6 explantes. Já para os modelos RALM® e BIT®, foram utilizados 750 mL de meio líquido para 25 explantes, para cada modelo. Assim, foi mantida a proporcionalidade nutricional de 30 mL de meio de cultura para cada explante.

Além dos modelos de biorreatores de imersão temporária, explantes foram cultivados em frascos contendo meio semissólido de mesma formulação, acrescido de agente gelificante – Phytigel (2,3 g L⁻¹). Para o frasco, foram utilizados 90 mL de meio semissólido para 3 explantes. A desproporcionalidade se deu porque cada repetição é representada por um explante e o tamanho de cada recipiente é variável. Para corrigi-la, as condições de cultivo foram todas padronizadas, sendo 30 mL de meio de cultura por explante, temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m⁻² s⁻¹. Após 90 dias de cultivo, avaliou-se o número de novas brotações formadas por explante. As brotações formadas foram separadas e inoculadas em meio básico de MS, complementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de Phytigel, para regeneração. A análise da regeneração foi realizada após 30 dias de cultivo, sendo avaliadas a taxa de sobrevivência das brotações, altura dos brotos e presença de raízes. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de mais de um broto por explante era esperada, considerando a presença de BAP no meio. Para a variável formação de brotos novos por explante, o modelo RALM® foi o que gerou melhores resultados ($8,2 \pm 0,3$) (Figura 2), seguido pelos modelos RITA® e o sistema tradicional, sem diferenças significativas entre si ($4,9 \pm 0,2$ e $4,3 \pm 0,6$, respectivamente). Ainda quanto à formação de brotos, o modelo BIT® não proporcionou resultado satisfatório ($1,2 \pm 0,1$), gerando brotos aclorofilados e com aparência hiperhídrica (Tabela 1).

Os resultados obtidos destoam daqueles relatados por Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016). Segundo esses autores, o modelo BIT® superou o RITA® na produção de brotos de *Vanilla planifolia*. O modelo BIT® também se mostrou eficiente na produção de biomassa e alongamento de brotos de espécies de plantas medicinais, conforme relatado por De Carlo *et al.* (2021). Por outro lado, estão em concordância com os resultados apresentados por Ramos-Castellá *et al.* (2014), os quais reportaram a maior eficiência do modelo RITA® na multiplicação de baunilha (*Vanilla planifolia*). Ressalta-se a ausência de literatura sobre o desempenho do biorreator do modelo RALM®. O não desenvolvimento de brotos no sistema BIT® pode ser explicado por diversas falhas que o sistema apresenta como, por exemplo, o borbulhamento do meio e o refluxo do meio do recipiente de armazenamento para o recipiente de cultura fazendo com que os explantes fiquem em contato parcial com o meio líquido por mais tempo que o programado. Sreedhar *et al.* (2009) e Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) relatam que a imersão parcial dos explantes em meio líquido pode causar a hiperhidricidade em brotos de *Vanilla planifolia*.



FIGURA 2. Avaliação da multiplicação clonal de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb.f.), com auxílio do biorreator de sistema de imersão temporária do modelo RALM®. Escala: 1 cm.

TABELA 1. Média do número de brotos por explante de *Vanilla phaeantha* Rchb.f. cultivados em diferentes sistemas de imersão temporária (RITA®, RALM® e BIT®) e em frascos tradicionais (semissólido).



Tratamento	Nº de Broto / Explante
Tradicional (controle)	4,3 ± 0,6 b
RITA®	4,9 ± 0,2 b
RALM®	8,2 ± 0,3 a
BIT®	1,2 ± 0,1 c

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. ± Erro padrão.

Na fase de alongamento e enraizamento das brotações (regeneração) (Figura 3), o sistema RALM® também proporcionou melhores resultados (1,0 ± 0,0 e 50,0 ± 10,0, respectivamente), seguido do sistema tradicional controle em frasco (0,6 ± 0,1) que se mostrou melhor que o sistema RITA® (0,3 ± 0,1), como pode ser observado na Tabela 2. Já o sistema BIT® foi ineficaz, sob as condições de estudo, para o alongamento e enraizamento de brotações de *Vanilla phaeantha*.

TABELA 2. Médias de altura e enraizamento de brotos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. cultivados em diferentes biorreatores de imersão temporária (RITA®, RALM® e BIT®) e em frascos tradicionais (semissólido), durante a fase de regeneração.

Tratamento	Altura (cm)	Enraizamento (%)
Tradicional (controle)	0,6 ± 0,1 b	60,0 ± 10,0 a
RITA®	0,3 ± 0,1 c	10,0 ± 10,0 b
RALM®	1,0 ± 0,0 a	50,0 ± 10,0 a
BIT®	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. ± Erro padrão.

CONCLUSÕES

Dentre os modelos de biorreatores testados, o RALM® destacou-se, proporcionando alta taxa de multiplicação de brotos, 100% de alongamento e formação de plantas viáveis para o cultivo *ex vitro*, sendo, dessa forma, uma alternativa para a produção em escala massal de *Vanilla phaeantha*.

REFERÊNCIAS

- BRAMEL, P.; FREY, F. Global strategy for the conservation and use of Vanilla genetic resources. Bonn, Germany: **Global Crop Diversity Trust**, 2021. 62 p.
- DE CARLO, A.; TARRAF, W.; LAMBARDI, M.; BENELLI, C. Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2414, 2021.
- DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species, in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 175-180, 2006.
- FERRARA, L. Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*: A narrative review. **International Journal of Medical Reviews**, v.7, n. 1, p. 22-26, 2019.



GANTAIT, S.; KUNDU, S. In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 9, p. 1-19, 2017.

HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A. de; MATOS, G. B. de. **Cultivo de baunilha**: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 24 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 254).

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-2. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 31 de agosto de 2023.

LEE-ESPINOSA, H. E.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; GARCÍA-ROSAS, B.; CÓRDOVA-CONTRERAS, A. L.; LAGUNA-CERDA, A.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; BARAHONA-PÉREZ, L. F.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; SANTANA-BUZZY, N. In vitro Clonal Propagation of *Vanilla (Vanilla planifolia 'Andrews')*. **Hortscience**, v. 43, n. 2, p. 454-458, 2008.

MENEZES, T. P.; GOMES, W. A.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p.868-876, 2012.

NOGUEIRA, J. S.; COSTA, F. H. S.; VALE, P. A. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH. p.103-129, 2017.

OLIVEIRA, S. O. D.; SAYD, R. M.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, n. unico, p. 204-209, 2013.

POWO. Plants of the World Online 2023. **Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>> Acesso em: 03 de agosto de 2023.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 2, p. 154-160, 2016.

RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 50, n. 5, p. 576-581, 2014.

SREEDHAR, R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 1, p. 46-57, 2009.