

Indução a mutação de orquídeas pelo agente metil-metanosulfonato

Induction of orchid mutation by the methyl-methanesulfonate agent

RESUMO

Amanda de Souza Ferreira
amandaferreira@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil

Betty Cristiane Kuhn
bettykuhn@professores.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil

O mercado ornamental de flores movimenta milhões na economia brasileira, um fator chave para agregação de valor das espécies é o número de exemplares disponíveis. Com essa necessidade de inovação, podem ser trabalhadas técnicas de indução a mutação genética em orquídeas, obtendo dessa forma genomas que resultam em fenótipos únicos e inovadores. No presente experimento, utilizou-se do agente mutagênico metil-metanosulfonato (MMS) para induzir mutação na espécie de orquídea *Dendrobium nobile* previamente germinada. O objetivo do trabalho consistiu em atingir a DL₅₀. Nesse sentido, por meio da análise bibliográfica estabeleceu-se o período de 12 horas para o contato das plântulas com o mutagênico e realizou-se a variação da concentração do mutagênico de 0 a 60 ppm. Feito isso, contabilizou-se o número de brotamentos que foi alto e a observação da formação de calos nas orquídeas. A DL₅₀ ainda não foi atingida nessas concentrações analisadas, sugere-se para estudos futuros concentrações ainda maiores e alterações na metodologia do tempo de contato do mutagênico, como a adição do mesmo no próprio meio de cultura. Devido à diminuição do período de ensaio laboratorial em decorrência da pandemia de Sars-CoV-2, não foi possível realizar mais análises moleculares, como PCR e eletroforese, que pudessem comprovar a mutação.

PALAVRAS-CHAVE: Mutagênico. MMS. *Dendrobium nobile*. Mutação genética.

ABSTRACT

The ornamental flower market moves millions in the Brazilian economy, a key factor in adding value to the species is the number of specimens available. With this need of innovation, techniques of inducing genetic mutation in orchids might be required, thus obtaining genomes that result in unique and innovative phenotypes. In this experiment, it was used the mutagenic agent methyl-methanesulfonate (MMS) to induce mutation in the *Dendrobium nobile* orchid species previously germinated. The objective of the task was to reach the LD₅₀. In this sense, through the bibliographic analysis, a period of 12 hours was established for the contact of the seedlings with the mutagen and the variation of the mutagen concentration was performed from 0 to 60 ppm. That done, the high number of buds and the callus formation in the orchids were observed and counted. The LD₅₀ has not

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



been reached in these analyzed concentrations, it is suggested for future studies even higher concentrations and changes in the methodology of time contact with the mutagen, such as its addition in the culture environment itself. Due to the decrease in the laboratory test period caused by the Sars-CoV-2 pandemic, it was not possible to carry out more molecular analyzes, such as PCR and electrophoresis, that could prove the mutation.

KEYWORDS: Mutagenic. MMS. *Dendrobium nobile*. Genetic mutation.

INTRODUÇÃO

As primeiras orquídeas encontradas datam de 15 milhões de anos, na Ásia e, atualmente, formam o grupo das plantas mais evoluídas, adaptadas a quase todos os ambientes (CAMARGO E CASTRO et. al., 2017) e, no quesito extensão, compõem o segundo maior grupo das angiospermas (GOVAERTS et. al., 2011). Elas são dotadas por uma beleza única que, no decorrer do tempo, atraiu a atenção de diversos povos que resultou em estudos sobre suas formas de cruzamentos, cuidados e usos. Com características peculiares, suas sementes são minúsculas e se assemelham a um pó, com cada flor fecundada produzindo cerca de 700.000 sementes (VANIQUE; COELHO, 1996), apesar da quantidade significativa, são difíceis os métodos germinativos tradicionais, devido à pequena reserva energética, necessitando, desse modo, de nutrientes do meio para que a germinação aconteça. Entre essas pesquisas observou-se a reprodução simbiótica da orquídea associada ao fungo *Micorriza*, nesse método, o sucesso germinativo girava em 2 a 3%, até que, em 1922, Lewis Knudson criou o meio de cultivo que recebeu seu nome, onde próximo de 100% das sementes germinavam (SILVA, 2003), produzindo um grande avanço para as técnicas de cultivo. Posteriormente, surgiram as técnicas de micropropagação que, se tornaram as mais indicadas para plantas difíceis de propagar, tal qual as orquídeas (HOFFMANN et. al., 1998), somam-se a isso as vantagens de se manter plantas com genéticas superiores e favorecer o bom aspecto fitossanitário (LAVATO et. al., 1996), tornando esse, o método mais utilizado nos dias atuais.

O mercado para essa espécie de plantas se consolidou no setor alimentício com a baunilha, a área medicinal na China e na Índia (CHUGH; GUHA; HAO, 2009) e, principalmente, na ornamentação. Na economia brasileira, o setor de exportação recebe 30 milhões pela venda de mudas, sementes e bulbos, já internamente, a movimentação gira em torno de 800 milhões de dólares (MOTOS, 1996). Esse avanço no mercado consumidor brasileiro decorreu da estabilização da moeda em 1994 que, provocou alta de consumo em diversos setores, sendo um deles, o de flores ornamentais e, além disso, houve a introdução da característica novidade no ramo, elevando a busca por novas espécies de orquídeas. Sendo assim, nos dias de hoje, estimam-se haver 100.000 híbridos da família *Orchidaceae* e a busca por novas espécies do gênero permanece crescente.

Para satisfazer o setor consumidor no âmbito de inovação, é possível também utilizar a técnica de indução a mutação que, consiste na aplicação de agentes mutagênicos com o objetivo de alterar o genoma das plantas aleatoriamente e produzir características morfológicas distintas das convencionais que, podem ser positivas para o setor econômico. Nesse sentido, a mutagenicidade nas orquídeas pode ocorrer através de diversos fatores, sejam eles físicos como os raios ultravioletas e raios X, ou químicos, por exemplo, alguns herbicidas como o 2,4-diclorofenoxiacético, azida sódica, cobalto-60 e o metil-metanosulfonato (MMS) (NASCIMENTO et. al., 1994).

Tendo em vista a importância da interação entre o genótipo da planta e o mutagênico para que ocorra a mutação (FILIPPETTI; DE PACE, 1986), o experimento delineou os períodos e as concentrações aplicadas do agente mutagênico escolhido, MMS. Com base no exposto, o presente trabalho consistiu

na determinação da dose letal do mutagênico, em metade da população (DL_{50}), de orquídeas da espécie *Dendrobium nobile* por meio do agente mutagênico MMS.

O teste de DL_{50} foi criado em 1927 por J. W. Trevan para testar a toxicidade de substâncias, o mesmo foi sendo aprimorado e, a partir da década de 70 tornou-se de amplo uso em agências reguladoras, tais como a americana Food and Drug Administration (FDA). Ele consiste na variação de concentração da substância testada sendo aplicada em um determinado organismo, em geral são utilizados camundongos e, nesse caso, são as orquídeas. A DL_{50} é atingida quando metade da população observada morre, esse parâmetro foi adotado em aplicações de defensivos agrícolas, como o MMS, devido a isso utilizou-se do método no presente trabalho (VALADARES, 2006).

METODOLOGIA

A determinação da dose letal 50 (DL_{50}) (DE BARROS; ARTHUR, 2005) foi realizada em sementes de *Dendrobium nobile* germinadas previamente no laboratório pelo trabalho de Iniciação Científica de Canan e Kuhn (2019), devido ao longo período germinativo. A mutação de orquídeas através do agente mutagênico metil-metanosulfonato baseou-se na literatura existente de indução em cana-de-açúcar (NARDINO et. al., 2017) para estabelecer protocolos, pois não foram encontrados testes do mesmo na família *Orchidaceae*. Com isso, definiu-se o período de 12 horas para contato do mutagênico com os explantes e, as concentrações foram variadas para análise de brotamentos e calos. No total desenvolveram-se três testes, os dois prévios com menor número de repetições para verificar se as plantas toleram tais concentrações. Já o terceiro, realizado com mais repetições por concentração para analisar estatisticamente o resultado daquelas determinadas concentrações. Conforme a Tabela 1:

Tabela 1 - Explicação dos testes 1, 2 e 3

Teste	Número	Concentração (ppm)	Nº de plantas	Nº de frascos
1	1	0	16	4
1	2	5	16	4
1	3	10	16	4
1	4	15	16	4
2	0	0	16	4
2	5	20	16	4
2	6	25	16	4
2	7	30	16	4
3	1	0	40	10
3	2	15	40	10
3	3	30	40	10
3	4	45	40	10
3	5	60	40	10

Fonte: Autoria própria (2020).

Os dois testes iniciais foram realizados para verificar o comportamento da *D. nobile* em contato com tais concentrações do mutagênico, visto que não foram encontrados estudos específicos do MMS nessa espécie. Enquanto o terceiro foi realizado com uma variação de concentrações e número de frascos maiores para possibilitar análises estatísticas e encontrar a DL_{50} .

Primeiramente, antes do início dos testes foram autoclavados por 30 minutos os materiais a serem utilizados no fluxo passíveis desse método de assepsia. Por conseguinte, realizou-se a limpeza do fluxo, das sacolas com materiais autoclavados com álcool 70% e do frasco de explante. No terceiro teste, realizou-se o preparo das soluções com concentrações de 0 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 45 ppm e 60 ppm, como informado na Tabela 1.

Os tratamentos foram preparados e em cada imersão das plantas foi observado o horário para que, posteriormente, pudessem ser retiradas da solução mutagênica. Finalizada essa etapa, o fluxo laminar foi fechado e aguardou-se o período de retirada. Ao se aproximar das 12 horas de imersão, o fluxo foi limpo novamente, cobrindo o frasco das plantas com papel Kraft, para que a luz UV não interfira no processo e, retornou-se ao trabalho dentro do fluxo laminar. Na mesma sequência de introdução das plantas em solução, ocorreu a retirada das mesmas, elas foram lavadas em 3 águas destiladas autoclavada distintas, para remover todo resquício do agente mutagênico e cessar o período de indução. Findadas as lavagens, iniciou-se o processo de inoculação das plântulas nos frascos de meio Knudson acrescido com as vitaminas do meio MS, realizando a correta assepsia da pinça no álcool 70% e na chama, colocaram-se 4 plantas por frasco em 10 frascos por concentração, fechando com 6 camadas de papel filme e etiquetando devidamente cada um. Esse mesmo processo repetiu-se nas 5 concentrações diferentes. Enfim, os 50 frascos foram levados à sala de cultivo de plantas, onde havia fotoperíodo controlado de 16 horas de luz por lâmpadas fluorescentes de luz branca de 16 W e 8 horas de escuro, além da climatização com temperatura constante de 25°C, condições ideais para a planta crescer fazendo uso do seu meio nutritivo. Observou-se ainda, o descarte correto dos rejeitos do agente mutagênico devido ao perigo de contaminação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste significativo, o objetivo de morte de metade das plantas devido ao elevado nível de mutação ainda não foi conquistado, seriam necessários mais testes aumentando ainda mais a concentração do agente, porém, devido à pandemia os mesmos não ocorreram. Embora não atingido o objetivo principal, o teste confirmou o potencial do MMS como indutor de brotamentos, como pode ser observado na Tabela 2, que teve seus dados computados excluindo-se o número de frascos em que ocorreram contaminação fúngica.

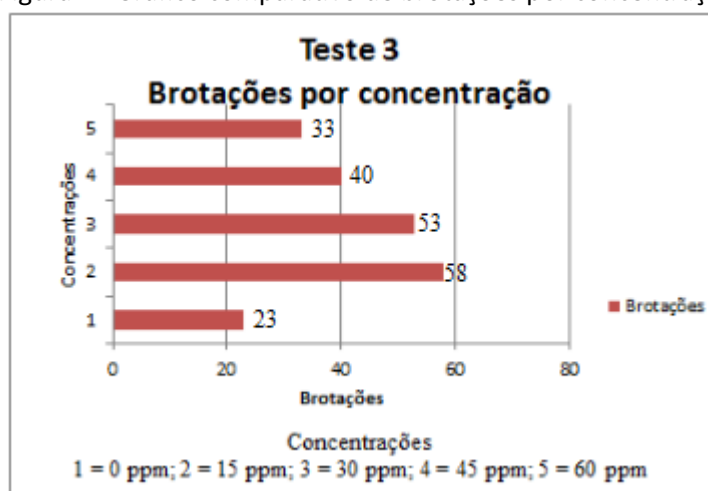
Tabela 2 - Análise do teste de DL_{50} , variando as concentrações com avaliação da porcentagem de plantas vivas, a média de brotações e média de calos.

Concentração	Concentração (ppm)	Plantas vivas (%)	Média de brotações	Média de calos
1	0	97,5	2,3	0,2
2	15	75	6,4	0,44
3	30	60	5,3	1,6
4	45	65,62	5	0,75
5	60	78,57	4,71	3,14

Fonte: Autoria própria (2020).

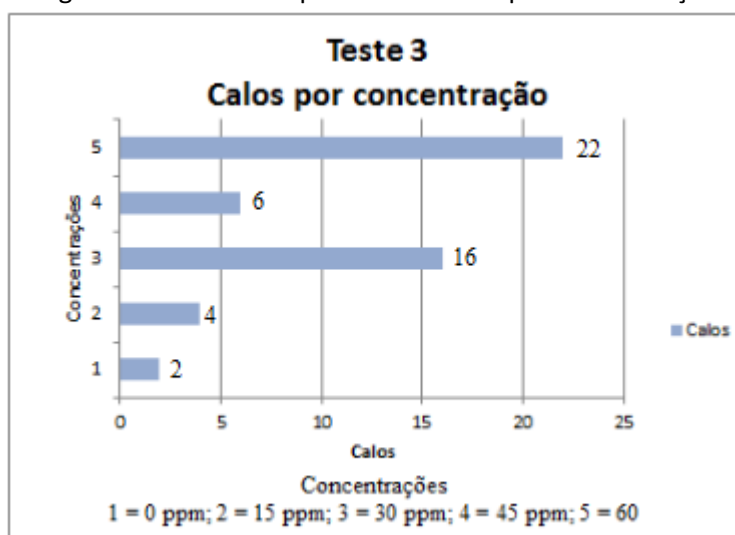
A representação gráfica da análise de brotações, calos e porcentagem de plantas vivas por concentração foi realizada e pode ser observada na Figura 1, 2 e 3.

Figura 1 - Gráfico comparativo de brotações por concentração



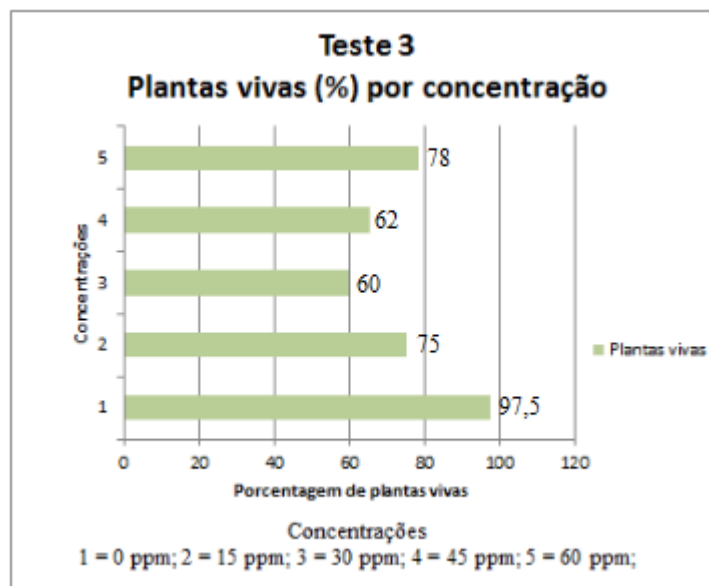
Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 2 - Gráfico comparativo de calos por concentração



Fonte: Autoria própria (2020).

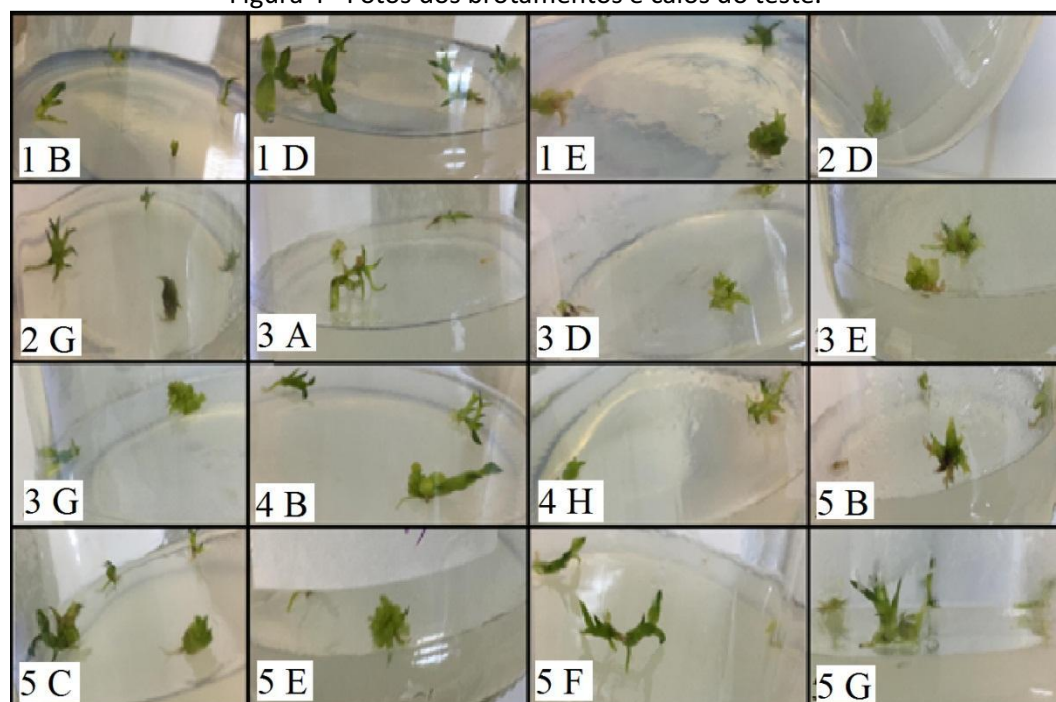
Figura 3 - Gráfico do teste comparativo de plantas vivas por concentração



Fonte: Autoria própria (2020).

Diante do exposto na tabela 2, juntamente com os gráficos das figuras 1, 2 e 3, é possível ver que ainda não houve um perfil de comportamento dos resultados definido nas concentrações utilizadas. Embora tenham sido visualizados brotamentos e calos, como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Fotos dos brotamentos e calos do teste.



Fonte: Autoria própria (2020).

É interessante analisar que, mesmo na concentração de 0 ppm, onde não havia MMS ocorreram alguns brotamentos e, isso pode ser explicado pelo estresse sofrido pelas plantas no cultivo *in vitro* que pode induzir mutações

espontaneamente. Além disso, na figura 4 podem ser observados calos e brotamentos em diversos tratamentos e, vale ressaltar que, na concentração máxima, de 60 ppm, ainda haviam frascos com as 4 plantas vivas.

CONCLUSÃO

Por fim, embora o experimento não tenha sido concluído em todas as suas fases, devido ao período de pandemia de Sars-CoV-2 e consequente afastamento dos discentes do Câmpus, não sendo feita uma análise mais detalhada do resultado, com as medidas e contagens de folhas, raízes e caules, pôde-se inferir que o trabalho foi válido como estudo inicial e delineamento na indução de mutação de orquídeas através do agente químico mutagênico metil-metanosulfonato. Nesse sentido, seriam necessários mais testes adequando a concentração do mutagênico ou a metodologia testada, sugerindo a alteração do método de imersão de 12 horas pela preparação do meio contendo o MMS, isso faria com que o tempo de contato aumentasse em muito, podendo reduzir, desse modo, as concentrações.

Logo, as alterações observadas foram interessantes e futuramente, as plantas passarão pelo processo de aclimação e floração, que poderá apresentar diferentes colorações, formatos e números de flores que comprovem, desse modo, a alteração no genoma da planta que provocou o distinto fenótipo. Além disso, podem ser realizados estudos adicionais para identificar mutações através de técnicas de biologia molecular como a extração do DNA, PCR e eletroforese, permitindo observar, assim, os locais onde ocorreu a mutação na *D. nobile*.

REFERÊNCIAS

- CAMARGO e CASTRO, P. R.; ANGELINI, B. G.; MENDES, A. C. C. M.; GARCIA, E. M. **Orquídeas**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, p. 15, 2017.
- GOVAERTS, R.; KRATOCHVIL, K.; GERLANCH, G.; CARR, G.; ALRICH, P.; PRIDGEON, A. M.; CAMPACCI, M. A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J.J.; **World checklist of Orchidaceae**, 2011. Disponível em: <http://www.kew.org/wcsp/monocots/>. Acesso em: 8 jun. 2014.
- VANIQUE, M. M.; COELHO, S. J. **Cultivo de orquídeas**. Lavras, MG: UFLA, 1996. Boletim Técnico. Série Extensão; Ano 5, n. 12.
- SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea Brassioccattleya Pastoral x Laeliocattleya Amber Glow**. Lavras: UFLA, p. 02, 2003.
- HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos – Tecnologia e aplicações: aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998.
- LAVATO, P. E.; TROUVELOT, A.; PEARSON, V. G.; GIANINAZZI, S. **Micorrização de plantas micropropagas**. Lavras-MG: UFLA/DCS/DCF, p. 175-178, 1996.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. **Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants**. Scientia Horticulturae, Amsterdam: p. 507-520, 2009.

MOTOS, J. R. **Manejo de doenças fúngicas em plantas ornamentais.** Correio Agrícola, São Paulo: p. 24-27, 1996.

NASCIMENTO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. I. F.; NETO, J. F. B.; FEDERIZZI, L. C. **Agentes mutagênicos e a intensidade de variabilidade genética no caráter estatura de plantas de aveia (*Avena sativa* L.).** Ciência Rural: v. 24, n. 2, p. 291-297, 1994.

FILIPPETTI, A., DE PACE, C. **Improvement of seed yield in *Vicia faba* L. by using experimental mutagenesis. II. Comparison of gama-radiation and ethyl-methane-sulphonate (EMS) in production of morphological mutants.** Euphytica, Wageningen, v. 35, p. 49-59, 1986.

VALADARES, M. C. **Avaliação de citotoxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀.”** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, p. 93-98. Goiânia, Goiás: 2006.

DE BARROS, A.; ARTHUR, V. **Determinação experimental da dose de redução do crescimento (GR50) e da dose letal (LD50) de soja irradiada por raios gama.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 249–253, 2005.

CANAN, D. E.; KUHN, B. C. **Germinação de orquídeas *in vitro*.** ISSN: 2179-331X. 2019.

NARDINO, M.; CARVALHO, I. R., FERRARI, M.; PELEGRIN, A. J.; SZARESKEI, V. J.; FOLLMANN, D. N.; CARON, B. O.; SCHMIDT, D.; SOUZA, V. Q. **Induction or mutation and measurement of genetic variability in sugarcane genotypes.** 2017.