



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS**  
**GENÉTICOS VEGETAIS**



**Gustavo Surlo Nascimento**

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÉTICA NA**  
**MICROPROPAGAÇÃO DE *CATTLEYA ELONGATA* BARB.**  
**RODR., ORQUÍDEA ENDÊMICA DA CHAPADA**  
**DIAMANTINA-BA**

Feira de Santana –BA

2020

**GUSTAVO SURLO NASCIMENTO**

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÉTICA NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE *CATTLEYA ELONGATA* BARB.  
RODR., ORQUÍDEA ENDÊMICA DA CHAPADA  
DIAMANTINA-BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach

Coorientadora: Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

Feira de Santana – BA

2020

**Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS**

Nascimento, Gustavo Surlo  
N195a Análise da estabilidade genética na micropropagação de *Cattleya  
elongata* barb. rodr., orquídea endêmica da Chapada Diamantina - BA /  
Gustavo Surlo Nascimento. - 2020.  
55f. : il.


Orientadora: Alessandra Selbach Schnadelbach  
Coorientadora: Moema Cortizo Bellintani

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2020.

1. Calos (Plantas). 2. Marcadores ISSR. 3. Organogênese. 4.  
Quimerismo. 5. Variação somaclonal. I. Schnadelbach, Alessandra Selbach,  
orient. II. Bellintani, Moema Cortizo, coorient. III. Universidade Estadual de  
Feira de Santana. IV. Título.


CDU: 582.594.2

## **BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 MARIA NAZARE GUIMARAES MARCHI  
Data: 21/08/2023 18:04:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Profa. Dra. Maria Nazaré Guimarães Marchi**

**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBaiano**

Documento assinado digitalmente  
 ALONE LIMA BRITO  
Data: 22/08/2023 09:07:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Alone Lima Brito**

**Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS**

Documento assinado digitalmente  
 ALESSANDRA SELBACH SCHNADELBACH  
Data: 21/08/2023 21:55:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach**

**Orientadora e Presidente da Banca**

**Universidade Federal da Bahia – UFBA**

Feira de Santana – BA

2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à Universidade Estadual de Feira de Santana e à Universidade Federal da Bahia, pelo suporte técnico, assim como às fontes de fomento, CAPES e CNPQ.

Agradeço igualmente às minhas orientadoras, Alessandra Selbach Schnadelbach e Moema Cortizo Bellintani pela enorme paciência e disposição ao longo dos anos.

A realização deste trabalho também não seria possível sem assistência das queridas colegas Izabela Dias e Izabela Ruas, que foram parceiras em tempo integral.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pelos ensinamentos e as palavras de incentivo. Obrigado também aos professores que foram grande fonte de saber e inspiração.

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Por fim, agradeço a Deus, à família e aos amigos que me ampararam durante os momentos difíceis desta trajetória.

## RESUMO

*Cattleya elongata* é uma espécie endêmica da Chapada Diamantina (BA) que possui elevado valor ornamental, tornando-a vítima do extrativismo predatório. Neste contexto a cultura de tecidos pode gerar muitas plantas em curto espaço de tempo. No entanto, a técnica pode promover a ocorrência variação somaclonal (VS) nas plantas produzidas. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência e entender a dinâmica da variação somaclonal durante a multiplicação *in vitro* de *C. elongata* através da utilização de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Para os brotos obtidos através da organogênese direta ao longo de sete gerações de subcultivo, VS foi detectada em 36,8% dos genótipos analisados, no entanto, as plantas portadoras de *loci* polimórficos ainda se mantiveram altamente similares às respectivas plantas mãe. Foi detectado polimorfismo a partir da segunda geração de subcultivo. Tanto o genótipo quanto o número de subcultivos desempenharam influência sobre a ocorrência e acúmulo de VS. Um novo fenômeno baseado na ocorrência de quimeras *in vitro* pode justificar parte da variação dos haplótipos. Constatou-se que a formação de brotos advindos de calos se deu por organogênese. Embora 26% dos calos analisados tenham apresentado *loci* polimórficos quando comparados às suas respectivas plantas mãe, nenhuma das 103 plantas regeneradas a partir destes apresentou VS, o que é atribuído ao provável efeito deletério da VS durante a organogênese dos brotos. Desta forma, tentou-se esclarecer a dinâmica da VS durante o cultivo *in vitro* de *C. elongata*, o que pode fornecer base não somente para o manejo *in vitro* da espécie, mas tornar-se um objeto modelo no entendimento de diversos fenômenos.

**PALAVRAS CHAVE:** Calos. Marcadores ISSR. Organogênese direta. Organogênese indireta. Quimerismo. Variação somaclonal.

## ABSTRACT

*Cattleya elongata* is endemic specie of Chapada Diamantina with high ornamental value, which makes it a victim of predatory extraction. In this context, tissues culture can generate many plants in a reduced time. However, the technique can promote the occurrence of somaclonal variation (SV) in produced plants. The present study aimed to verify the occurrence and understand the dynamics of SV during *in vitro* multiplication of *C. elongata* using ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers. For the plants obtained through direct organogenesis over seven generations of subculture, SV was detected in 36.8% of the analyzed genotypes, however, the plants carrying polymorphic *loci* still remained highly similar to the respective mother plants. Polymorphism was detected from the second generation of subculture. The genotype and the number of subcultures influenced the occurrence of SV. A new phenomenon based on the occurrence of chimeras *in vitro* may justify part of the variation in haplotypes. It was found that the formation of shoots from callus was due to organogenesis. Although 26% of the analyzed calli presented polymorphic *loci* when compared to their respective mother plants, none of the 103 regenerated plants from them presented SV, which is attributed to the probable deleterious effect of SV during the organogenesis of shoots. Therefore, an attempt was made to clarify the dynamics of SV during *in vitro* cultivation of *C. elongata*, which may provide a basis not only for the *in vitro* cultivation of the species, but also turn it a model object to understand several phenomena.

**KEY WORDS:** Callus. Chimerism. Direct organogenesis. Indirect organogenesis. ISSR markers. Somaclonal variation.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1 – ESTABILIDADE GENÉTICA DE <i>CATTLEYA ELONGATA</i> BARB. RODR. (ORCHIDACEAE) AO LONGO DE SETE GERAÇÕES DE PROPAGAÇÃO VIA ORGANOGÊNESE DIRETA</b>	<b>17</b>
1.1 Introdução	19
1.2 Material e métodos	20
1.3 Resultados e discussão	22
1.4 considerações finais	35
<b>REFEÊNCIAS</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 2 - GENETIC STABILITY OF <i>CATTLEYA ELONGATA</i> BARB. RODR. (ORCHIDACEAE) IN PROPAGATION VIA INDIRECT ORGANOGENESIS</b>	<b>43</b>
2.1 Resumo em português	44
2.2 Introdução	46
2.3 Material e métodos	48
2.4 Resultados e discussão	50
2.4 considerações finais	58
<b>REFEÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>64</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

Com cerca de 880 gêneros e 27,800 espécies, Orchidaceae é a maior família dentro das angiospermas, englobando 8% das plantas vasculares conhecidas (GIVNISH et al., 2016). Sua distribuição perpassa por quase todos os ambientes terrestres do planeta, com exceção dos polos e desertos extremamente secos (FARIA et al., 2004). No Brasil ocorrem 219 gêneros e 2446 espécies (BARROS et al., 2019).

A Chapada Diamantina é a porção baiana de uma cadeia de montanhas denominada Cadeia do Espinhaço e em sua extensão, pode-se encontrar um tipo vegetacional denominado campos rupestres (RAPINI et al., 2008). Neste ambiente há predominância de monocotiledôneas, tais como Orchidaceae, Bromeliaceae e Poaceae as quais acumularam características únicas que contribuem para a sobrevivência em condições de exposição a oscilações drásticas de temperatura, solos oligotróficos e ácidos além de restrições hídricas presentes nestes ambientes (CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002; RAPINI et al., 2008).

A Chapada Diamantina abriga cerca de 55 gêneros e 161 espécies de orquídeas (VAN DEN BERG; AZEVEDO, 2005; AZEVEDO; VAN DEN BERG, 2007). Dentre estes gêneros, encontra-se *Cattleya* Lindl., com distribuição exclusivamente neotropical e englobando 114 espécies que se destacam por apresentar flores grandes de elevado valor no mercado florístico (VAN DEN BERG, 2014).

*Cattleya elongata*. Barb. Rodr. (Figura 1) tem hábito rupícola e é endêmica das regiões de campos rupestres da porção central da Chapada Diamantina; as inflorescências apresentam de 1-5 grandes flores vermelho-amarronzadas, de labelo magenta, dispostas em racemos (CRUZ et al., 2003). O alto valor ornamental de *C. elongata*, induz à coleta indiscriminada, o que coloca em risco a viabilidade das populações naturais e faz com que a espécie conste no apêndice II do *Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora* (CITES, 2017).



**Figura 1** – *Cattleya elongata*. Fonte: Felipe Santos, 2019

Neste cenário, as técnicas da cultura de tecidos oferecem uma ferramenta valiosa para a conservação da espécie, possibilitando a produção de um grande número de plantas com qualidade fitossanitária elevada, em um curto período de tempo e em espaços reduzidos (SHAHZAD et al., 2017).

A cultura de tecidos abrange técnicas de cultivo em meio nutritivo de células, tecidos ou órgãos de planta, sob condições assépticas e controladas de luminosidade e temperatura. O meio nutritivo fornece água, macronutrientes, micronutrientes e as vitaminas necessárias ao vegetal (CALDAS et al., 1998). A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, possibilitando a obtenção de grande número de plantas a partir de pequenos fragmentos vegetais (YAM; ARDITTI, 2018). O sucesso da técnica deve-se ao fato de que, através da mesma, pode haver a retomada da totipotência original de células já diferenciadas, que permitem a multiplicação ilimitada de clones a partir do material base (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SHAHZAD et al., 2017).

Uma vez que células totipotentes tenham sido obtidas, faz-se necessário que estas se regenerem em novas plantas, processo conhecido como morfogênese. A morfogênese apresenta duas rotas possíveis, a organogênese e a embriogênese, ambas podem ocorrer por via direta ou por via indireta (com presença de calos) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na organogênese há o surgimento de órgãos a partir do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Já na embriogênese, células somáticas geram embriões análogos aos embriões zigóticos (PHILLIPS, 2004).

Por se basear apenas na divisão mitótica das células, pensava-se que plantas geradas através da cultura de tecidos fossem sempre clones do material base (LARKIN, 1998). No entanto, em alguns momentos, variações genéticas ou fenotípicas em plantas obtidas através da técnica podem ser observadas, quando comparadas às matrizes (AKDEMIR et al., 2016; BRADAĬ et al., 2019). A esse fenômeno dá-se o nome de variação somaclonal (VS) (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Atualmente, se aceita como VS, qualquer mudança genética e/ou epigenética entre os clones regenerados quando comparados à planta matriz correspondente (KAEPPLE et al., 2000 e LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Esse fenômeno tem como causas fatores como, idade do material *in vitro*, número de subcultivos, uso de reguladores vegetais no meio de cultura, condições de cultivo, taxa de divisão do material, espécie e genótipos trabalhados (BAIRU et al., 2011)

O tecido calogênico é frequentemente visado na cultura de tecidos, com o intuito de promover a multiplicação em massa de plantas. Porém, assume-se que taxas elevadas de VS podem estar associadas ao surgimento destes tecidos devido à dinâmica celular e às condições necessárias para estabelecimento dos mesmos (KRISHNA et al., 2016).

A ocorrência de VS tem implicações variadas. Se o objetivo da cultura de tecidos for obter exclusivamente clones da planta mãe, a variação somaclonal é deletéria, podendo gerar características indesejadas nas plantas regeneradas (MARTÍNEZ et al., 2017; KRISHNA et al., 2016). No entanto, tal fonte de variação pode ser útil no melhoramento vegetal promovendo o surgimento de características desejáveis para as mais variadas culturas, a exemplo da cana de açúcar, tomate, arroz e orquídeas como as do gênero *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis* (BARDEN et al., 1986; MANCHANDA et al., 2018; ROY; MANDAL, 2005; TOKUHARA; MII, 1998).

Existe uma grande gama de métodos para detecção da variação somaclonal, os quais podem ter como base análises fenotípicas (detecção morfológica, bioquímica e fisiológica) ou análises genotípicas (citológicas, RFLP, SSR, ISSR, RAPD e AFLP) (BAIRU et al. 2011; ŻABICKI et al, 2019). No entanto, análises de DNA, tendem a ser muito mais informativas, devido à sua capacidade de acessar *loci* que nem sempre detém influência sobre o fenótipo (EVANS et al., 1984).

O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é um tipo de marcador dominante, onde os alelos são detectados pela presença/ausência de bandas, que representam fragmentos de DNA

amplificado durante reação de PCR. Os fragmentos amplificados por essa técnica se localizam entre regiões de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas (REDDY et al., 2002). Este tipo de marcador apresenta vantagens consideráveis, como o baixo custo, demanda de pequenas quantidades de DNA, rapidez na obtenção de resultados, alta reprodutibilidade, possibilidade de geração de perfil complexo de bandas além de não ser exigido conhecimento prévio sobre o genoma trabalhado (REDDY et al., 2002 e VIEHMANNNOVA et al., 2014). O alto polimorfismo obtido através do marcador, o torna ideal para distinguir variabilidade entre indivíduos mesmo que estes sejam estreitamente relacionados (REDDY et al., 2002). Tais características tornam os marcadores ISSR ideais para a detecção de variação somaclonal (AKDEMIR et al., 2016; IANNICELLI et al., 2016; ŽABICKI et al., 2019).

Trabalhos que visam a multiplicação *in vitro* de *C. elongata* ainda são extremamente escassos, e embora um protocolo de micropropagação tenha sido proposto por Viana (2013) para a espécie, a susceptibilidade da mesma à VS nunca foi testada.

O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência e entender a dinâmica da variação somaclonal durante a multiplicação *in vitro* de *C. elongata* através da utilização de marcadores ISSR.

## Referências

- AKDEMIR, H.; SUZERER, V.; TILKAT, E., ONAY, A.; ÇİFTÇİ, Y. O. Detection of variation in long-term micropropagated mature pistachio via DNA-based molecular markers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 7, p. 1301-1312, 2016.
- AZEVEDO, C. O.; VAN DEN BERG, C. Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseada em espécies de Orchidaceae. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 7, p. 199-210, 2007.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.
- BARROS, F. et al. (2011). *Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.
- BARDEN, K. A.; SMITH, S. S.; MURAKISHI, H. H. Regeneration and screening of tomato somaclones for resistance to tobacco mosaic virus. **Plant science**, v. 45, n. 3, 209-213, 1986.
- BRADAĬ, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; MARTÍN, C. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. **Scientia Horticulturae**, v. 251, p. 260-266, 2019.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. v.1, p. 87-132, 1998.
- CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices II, 2017. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>>. Acesso em: 5 jun, 2019.
- CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v.29, n. 1, 37-48, 2002.
- CRUZ, D. D. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no estado da Bahia. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1-2, p. 26-34, 2003.

EVANS D. A.; SHARP W. R.; MEDINA-FILHO H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal of Botany**, v.71, p. 759–774, 1984.

FARIA, R. T. et al. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n. 4, p. 309-314, 2004.

GIVNISH, T. J. et al. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. **Journal of Biogeography**, v.43, n. 10, p. 1905-1916, 2016.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. v.1, p. 87-132, 1998.

IANNICELLI, J. et al. *In vitro* propagation of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers of *in vitro*-cultured plants. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 115, n. 1, 67-76, 2016.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Gene Silencing**. Springer, Dordrecht, p. 59-68, 2000.

KRISHNA, H. et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016.

LARKIN P. J. Introduction. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (Eds) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p 3–13, 1998.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and applied genetics**, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

MANCHANDA, P.; KAUR, A.; GOSAL, S. S. Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. **Biotechnologies of Crop Improvement**, v. 1, p. 299-326, 2018.

MARTÍNEZ E. E. et al. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.53, n. 6, p. 553-560, 2017.

- PHILLIPS, G. C. *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v. 40, n. 4, p. 342-345.
- RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. ***Megadiversidade***, v. 4, v.1, p. 6-24, 2008.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. ***Euphytica***, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.
- ROY, B.; MANDAL, A. B. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation. ***Euphytica***, v. 145, n. 3, p. 221-227, 2005.
- SHAHZAD, A. et al. Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. ***Plant Biotechnology: principles and applications***, Singapura, p. 37-72, 2017.
- TOKUHARA, K.; MII, M. Somaclonal variations in flower and inflorescence axis in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. ***Plant Biotechnology***, v. 15, n. 1, p. 23-28, 1998.
- VAN DEN BERG, C. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). ***Phytotaxa***, v. 186, n. 2, 75-86. 2014.
- VIANA, C. M. Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae Juss.). Dissertação, Universidade Federal da Bahia. 2013.
- VIEHMANNOVA, I. et al. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. ***Electronic Journal of Biotechnology***, v. 17, n. 2, p.102-106. 2014.
- VAN DEN BERG, C.; AZEVEDO, C. O. Orquídeas. ***Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. Ministério do Meio Ambiente, Brasília***, p. 195-208, 2005.
- YAM, T. W.; ARDITTI, J. Orchid Micropropagation: An Overview of Approaches and Methodologies. In: ***Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols***. Humana Press, Nova York, p. 151-178. 2018.

ŽABICKI, P. et al. Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic studies of *in vitro* propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit.(Violaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, n. 2, p. 339-352, 2019.



## **CAPÍTULO 1**

**ESTABILIDADE GENÉTICA DE *CATTLEYA ELONGATA* BARB. RODR.  
(ORCHIDACEAE) AO LONGO DE SETE GERAÇÕES DE PROPAGAÇÃO VIA  
ORGANOGENESE DIRETA**

Artigo a ser submetido ao periódico *PLANT CELL REPORTS*

**ESTABILIDADE GENÉTICA DE *CATTLEYA ELONGATA* BARB. RODR.  
(ORCHIDACEAE) AO LONGO DE SETE GERAÇÕES DE PROPAGAÇÃO VIA  
ORGANOGÊNESE DIRETA**

Gustavo Surlo Nascimento<sup>1</sup>, Izabela Leonardo Ruas<sup>1</sup>, Maria Nazaré Guimarães Marchi<sup>2</sup>,  
Moema Cortizo Bellintani<sup>3</sup> e Alessandra Selbach Schnadelbach<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil;

<sup>2</sup> Instituto Federal Baiano, Campus Catu, Bahia, Brasil;

<sup>3</sup> Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil.

Corresponding author- Gustavo Surlo Nascimento

E-mail: [gustavosurlo@gmail.com](mailto:gustavosurlo@gmail.com),

Telephone: +55(71)993993656

Agradecimentos – Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). Agradecemos à Universidade Federal da Bahia e à Universidade Estadual de Feira de Santana pelo suporte técnico.

Resumo – *Cattleya elongata* é endêmica das áreas de campos rupestres da Chapada Diamantina e por possuir elevado valor ornamental, a espécie sofre com o extrativismo predatório. Neste cenário, a cultura de tecidos pode fornecer um grande número de plantas em pouco tempo, porém, a técnica pode promover o surgimento de variação somaclonal (VS). O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade genética, através de marcadores ISSR, de plantas micropropagadas de *C. elongata* de sete gerações de propagação via organogênese direta, assim como estimar o potencial morfogenético das mesmas após cada ciclo de multiplicação. O número de brotos advindos de cada subcultura não variou até a sétima geração. A oxidação fenólica durante o estabelecimento das gerações foi o maior empecilho à micropropagação da espécie, provocando morte dos explantes. Seis marcadores ISSR (AW3, MANNY, MAO, UBC844, UBC898, UBC901) apontaram ocorrência de variação somaclonal em 36,8% dos genótipos analisados, no entanto, o índice de similaridade genética entre os mesmos se manteve alto. *Loci* polimórficos foram detectados a partir da segunda geração de subcultivo. O genótipo parece influenciar fortemente na ocorrência de VS para *C. elongata*, porém também verificou-se um aumento nas taxas de VS até a terceira geração. Nenhuma alteração morfológica foi detectada nas plantas geradas ao longo dos ciclos de multiplicação.

Palavras Chave – Marcadores ISSR, Orquídea, Potencial morfogenético, Variação Somaclonal.

## Introdução

A Chapada Diamantina está localizada no norte de uma cadeia de montanhas denominada Cadeia do Espinhaço, a qual se estende da Serra do Ouro Branco em Minas Gerais até a Serra da Jacobina, no nordeste da Bahia. Em sua extensão, pode-se encontrar um tipo vegetacional denominado campos rupestres (Rapini et al. 2008).

Os campos rupestres ocorrem no Cerrado e Caatinga, a partir de 900 m de altitude (Rapini et al. 2008). Neles, há predominância das monocotiledôneas, as quais acumulam características únicas que possibilitam à sobrevivência às condições de exposição a oscilações drásticas de temperatura, solos oligotróficos e ácidos, além de restrições hídricas presentes nestes ambientes (Giulietti et al. 1987; Conceição e Giulietti 2002; Rapini et al. 2008).

Como resposta a padrões microclimáticos e de solos, os campos rupestres abrigam grande diversidade florística (Giulietti et al. 1996). Tal riqueza também é atribuída ao padrão disjuncto desse tipo de vegetação, que associado ao seu isolamento conduz as populações a eventos de especiação, gerando altas taxas de endemismo (Rapini et al. 2008).

A família Orchidaceae tem forte presença nos campos rupestres da Chapada Diamantina e conta com cerca de 55 gêneros e 161 espécies de orquídeas (Azevedo e van den Berg 2007). *Cattleya elongata* Barb. Rodr é uma orquídea endêmica desta região que apresenta elevado valor ornamental devido a suas grandes flores vermelho-amarronzadas, de labelo magenta (Cruz et al. 2003). A espécie sofre com a perda de habitat e com o extrativismo predatório, o que faz com que *C. elongata* conste no apêndice II do *Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora* (CITES 2017).

Neste cenário, a cultura de tecidos vegetais pode possibilitar a obtenção de um grande número de plantas com qualidade fitossanitária elevada, em períodos curtos de tempo, e em qualquer época do ano (Suzuki e Ferreira 2007), reduzindo assim as pressões sobre as populações naturais. O sucesso da técnica se baseia na capacidade de retomada da totipotência e multiplicação das células vegetais (Shahzad et al. 2017) e embora envolva exclusivamente divisões mitóticas, plantas genética ou fenotipicamente distintas das matrizes podem ser geradas, em decorrência de um fenômeno denominado Variação Somaclonal (VS) (Larkin e Scowcroft 1981).

Define-se como VS qualquer mudança genética e/ou epigenética entre os clones regenerados quando comparados à planta matriz correspondente (Larkin e Scowcroft 1981;

Kaeppler et al. 2000). Muitos fatores podem influenciar na ocorrência e frequência de VS. Entre eles, idade do material *in vitro*, número de subcultivos, uso de reguladores vegetais no meio de cultura, condições de cultivo, taxa de divisão do material, espécie e genótipos trabalhados (Bairu et al. 2011).

A detecção da VS pode se dar tanto a nível fenotípico (morfológico, bioquímico ou fisiológico), quanto genotípico (citológico e marcadores moleculares) (Bairu et al. 2011; Żabicki et al. 2019). Dentre os marcadores moleculares, o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) se mostra particularmente eficiente para a detecção da VS. Devido ao alto polimorfismo detectado através do mesmo, é possível distinguir variabilidade entre indivíduos, mesmo que estes sejam estreitamente relacionados (Alhani e Wilkinson 1998; Reddy et al. 2002). A ocorrência de VS pode ter consequências deletérias, quando se objetiva obtenção exclusivamente de clones do material base (Krishna et al. 2016; Martínez et al. 2017). No entanto a VS também pode promover o surgimento de características desejáveis, especialmente para plantas ornamentais, devido ao mais amplo aproveitamento de novas características por parte do mercado florístico (Hsu et al. 2008; Rodrigues 2008).

Outro fator que merece atenção durante a micropropagação é a manutenção do potencial morfogenético do material vegetal. Culturas mantidas por longos períodos tendem a apresentar redução na sua capacidade morfogenética, o que representa uma grande limitação à produção de plantas *in vitro* (Chaturvedi e Jain 1994; Kumar e Kumar 2014). No entanto, a resposta morfogenética pode variar de acordo com a espécie trabalhada (Rubluo et al. 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial morfogenético durante seis ciclos de multiplicação *in vitro* de *C. elongata*, bem como analisar a estabilidade genética de mudas micropropagadas através de marcadores ISSR.

## **Material e métodos**

### *Local de execução e material vegetal*

Este estudo foi conduzido nos Laboratórios de Genética e Evolução Vegetal (LAGEV) e de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foram utilizadas 260 plantas portando entre 3-5 cm de parte aérea, as quais foram provenientes do banco ativo de germoplasma (BAG) do LCTV. A obtenção destas

plantas se deu a partir da germinação *in vitro* de sementes em meio MS (Murashige e Skoog 1962) com metade da concentração salina, contendo 1% de mioinositol, 1% de solução F, 2% de carvão ativado e 6g L<sup>-1</sup> de ágar; As sementes utilizadas para estabelecimento do BAG foram oriundas dos municípios de Mucugê, Morro do Chapéu e Campo Formoso (Viana 2013). As plantas utilizadas no experimento apresentavam idades entre cinco e sete anos.

#### *Meio de Cultura*

O meio de cultura (15 mL/tubo) utilizado foi o MS (Murashige e Skoog 1962) com metade da concentração salina, contendo 1% de mioinositol, 1% de solução F, 2% de carvão ativado e 6g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 e o meio foi autoclavado durante 15 min. a 121°C e 1,5 atm. Não foram adicionados reguladores vegetais ao meio (Viana 2013). Foram utilizados tubos de ensaio com capacidade para 50 mL, vedados com filme de PVC.

#### *Multiplicação in vitro de C. elongata*

Os explantes que compuseram a geração parental, tida neste estudo como primeira geração (P), tiveram meristema apical, folhas e raízes removidas em câmara de fluxo laminar, sendo o rizoma inoculado em meio de cultura. As culturas foram mantidas no escuro por sete dias e posteriormente foram alocadas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz/dia, intensidade luminosa de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 25  $\pm$  2°C.

Os brotos gerados após 90 dias foram contabilizados e destacados dos explantes. Estes brotos tiveram meristema apical, folhas e raízes removidos e o rizoma foi inoculado em meio de cultura e mantido sobre as mesmas condições supracitadas. O processo foi repetido por seis vezes consecutivas a cada 90 dias, e os brotos advindos de cada uma das seis gerações de subcultivo subsequentes foram nomeados em ordem cronológica como G2, G3, G4, G5, G6 e G7. Desta forma, as plantas pertencentes à primeira geração (P) originaram os brotos de G2, que através do mesmo processo originaram os demais brotos em G3, G4, G5, G6 e G7.

Determinou-se que para o estabelecimento de um novo subcultivo, os brotos gerados deveriam portar tamanho equivalente ao da geração de subcultivo anterior (3-5 cm). Desta forma, os brotos que compuseram a G3 e G6 só atingiram os tamanhos estabelecidos para serem utilizados como explantes após 210 dias, por isso o tempo de cultivo dessas duas gerações foi maior que o das demais.

#### *Extração e amplificação do DNA*

Aproximadamente 1g de folhas e raízes, retiradas durante o estabelecimento de cada subcultura, foi utilizado para a extração de DNA com base no protocolo brometo cetil-trimetilamônio 2% (CTAB) de Doyle & Doyle (1987) adaptado para microtubos. O DNA foi ressuspenso em 80 µL de tampão TE e armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

As amplificações foram realizadas em um volume final de 19,5 µL, contendo tampão de reação 1X, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM de primer, 0,2mM dNTPs, 0,75 U de Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA template. Foram testados 20 primers de ISSR, dos quais foram selecionados seis com resolução satisfatória para análise: AW3 (5'-GTG TGT GTG TGT RG-3'), MANNY (5'-CAC CAC CAC CAC RC-3'), MAO (5'-CTC CTC CTC CTC RC-3'), UBC 844 (5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRC-3'), UBC 898 (5'-CAC ACA CAC ACA RY-3') e UBC 901 (5'-GTG TGT GTG TGT YR-3').

O produto das reações foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,6 % em tampão Tris-EDTA-Ácido acético -TAE 1X. Os géis foram corados com Gelred® e fotografados sobre luz UV. Por fim, o perfil genético dos indivíduos foi convertido em uma matriz de presença e ausência de bandas (0 e 1).

#### *Análise dos dados*

O número de brotos obtidos em cada geração de subcultivo foi avaliado através de análise da variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade no programa estatístico Sisvar 5.1 (Ferreira 2011).

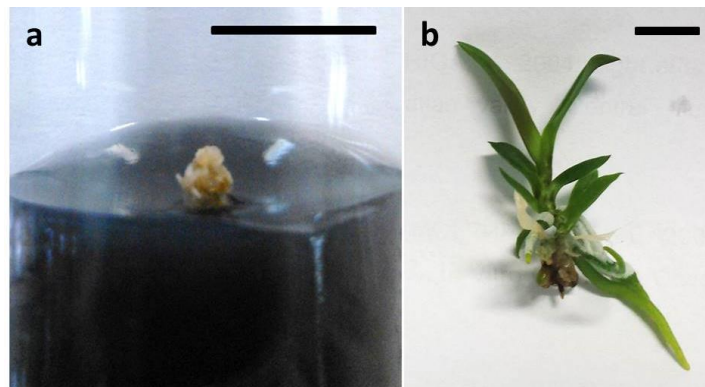
A estabilidade genética das plantas foi analisada por meio da comparação dos padrões eletroforéticos para cada primer entre os clones (brotos) obtidos a partir do mesmo explante e as plantas parentais.

A similaridade genética de Jaccard entre as diferentes gerações de clones e suas respectivas plantas mãe foi calculada no programa Past 3.0 (Hammer et al. 2001). A análise de agrupamento também foi realizada no programa Past 3.0, utilizando algoritmo UPGMA e índice de similaridade de Jaccard.

## **Resultados e Discussão**

### *Potencial morfo genético durante ciclos de multiplicação*

Dentre os 260 genótipos iniciais, apenas 19 chegaram à sétima geração. Significativas perdas se deram de modo progressivo e constante ao longo das gerações, principalmente em função da oxidação fenólica (OF), caracterizada pela progressiva aquisição da coloração marrom por parte dos explantes (Figura 1a). O escurecimento dos tecidos geralmente se deu entre uma e três semanas após a inoculação, sendo este o período crítico para as culturas. Os efeitos da OF tendiam a ser detectados inicialmente nas zonas seccionadas do explante, afetando posteriormente toda a extensão do mesmo. Tal processo é atribuído à injúria durante a repicagem do explante, a qual propicia a liberação de fenóis por parte das células. Os compostos fenólicos, por sua vez, oxidam, produzindo quinonas, as quais influem na atividade enzimática celular, acarretando a morte dos tecidos (Ahmad et al. 2013).



**Figura 1-** Explantes de *C. elongata*. **a** - Efeito da oxidação fenólica no explante, Barra - 1cm. **b** – Brotos gerados por organogênese direta, Barra - 1cm.

A OF é um problema sério associado à cultura de tecidos para diversas espécies (Ahmad et al. 2013). Células de orquídeas *in vitro* apresentam grandes quantidades de fenóis (Chugh et al. 2009). Essa característica interfere negativamente na micropropagação nos mais diversos gêneros da família Orchidaceae, tais como *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Liparis*, *Dendrobium*, *Phalaenopsi*, *Renanthera* e *Vanda* (Seeni e Latha 1992; Seeni e Latha 2000; Minamiguchi e Machado Neto 2007; Kaewubon et al. 2015; Jakobsone e Osvalde 2019). *Cattleya* também tende a apresentar compostos fenólicos em seus tecidos (Kako 1973).

Dentre as práticas adotadas neste estudo para minimizar o efeito da OF estão a adição de carvão ativado ao meio de cultura e o ato de manter as culturas recém inoculadas no escuro por sete dias (Ahmad et al. 2013), além do uso do meio MS com metade das concentrações salinas (Flores et al. 1998). No entanto, apesar da adoção destas medidas, foi observada a ocorrência de OF no presente estudo, a qual impactou negativamente a micropropagação de *C.*

*elongata*. Dentre os fatores que podem ter contribuído para as perdas pela OF está a ausência da utilização agentes antioxidantes (Ahmad et al. 2013).

Embora haja uma relação entre a susceptibilidade à OF e o genótipo (Silva et al. 2018), este não parece ter sido um fator relevante para este estudo. Tendo em vista que os explantes utilizados portavam variabilidade genética representativa da espécie em função de serem provenientes do BAG preestabelecido para *C. elongata* (Viana 2013), a espécie se mostrou muito sensível à OF. Desta forma, a ocorrência de OF deve ser um dos principais pontos considerados durante a micropropagação de *C. elongata*.

Todos os brotos obtidos neste estudo foram provenientes da ativação das gemas axilares presentes nos rizomas (Figura 1b), caracterizando organogênese direta. Eventuais calos surgidos ao longo das culturas foram descartados, o que impossibilita o surgimento de plantas através da organogênese ou embriogênese indireta (Phillips 2004), além disso a ocorrência de embriogênese direta também foi desconsiderada por não ter sido detectado nenhum corpo semelhante a protocormo (CSP) ao longo dos subcultivos. Os protocormos são as primeiras estruturas que se formam a partir das sementes em orquídeas, como resultado do desenvolvimento do embrião zigótico. Desta forma, o surgimento de um CSP seria indicador da ocorrência de uma rota análoga, a embriogênese somática (Ishii et al. 1998). A ausência de estruturas que denotem outras vias morfogênicas (calos ou CSPs) corrobora fortemente a suposição de que os brotos obtidos no estudo resultaram de organogênese direta.

Notou-se que a cada três ciclos de multiplicação os explantes não alcançaram o tamanho mínimo estipulado dentro do prazo de 90 dias inicialmente considerado para o prosseguimento do experimento. Desta forma, ao final de cada três ciclos, um período de 210 dias foi estabelecido para que houvesse a retomada do potencial morfogenético por parte dos explantes. Tal resultado contrasta com o que foi descrito por Civatti et al. (2017), que verificaram uma aceleração da resposta organogênica após três subcultivos de duas espécies do gênero *Micranthocereus*. No entanto, uma resposta parecida foi obtida para *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken que passou a produzir brotos com tamanho reduzido a partir do terceiro subcultivo (Flores et al. 2006). Embora apresentem resultados contrastantes, a manutenção da capacidade morfogenética nestes estudos parece estar associada às oscilações dos níveis endógenos de hormônios vegetais, o que também justificaria o aumento no tempo de resposta por parte dos explantes de *C. elongata* a cada três subcultivos.



Apesar do aumento no tempo de resposta a cada três ciclos de subcultivo, não houve diferença significativa para o número de brotos produzidos em cada geração (Tabela 1). Respostas altamente variáveis podem ser obtidas em relação ao potencial morfogênético a depender da espécie trabalhada. Bhowmik et al. (2016), no estudo de uma espécie de gengibre medicinal, verificaram o aumento de 1,77 vezes no número médio de brotos após a terceira subcultura. Já para um estudo realizado com hibiscos (Konar et al. 2019), o número de brotos advindos de cada subcultura diminuiu progressivamente com o avanço das mesmas

**Tabela 1-** Relação da média do número de brotos durante cada geração de subcultivo para *C. elongata*.

Geração de subcultivo						
	G2	G3	G4	G5	G6	G7
<b>Média de brotos</b>	3,47a	2,94a	2,42a	3,73a	2,15a	3,36a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ( $p>0,05$ ).

Para a família Orchidaceae, um resultado extraordinário foi descrito por Gopi et al. (2006) para *Vanilla planifolia* Andrews. Segundo os autores, o número de brotos produzidos por explante dobrava a cada subcultura, chegando a 120 brotos por explante ao fim da terceira subcultura. No entanto, os autores não avaliaram a estabilidade genética das plantas obtidas, e afirmaram que em culturas prolongadas os brotos apresentavam morfologia anômala e escurecimento dos meristemas apicais. Embora um número menos expressivo de brotos tenha sido obtido para *C. elongata*, nenhuma alteração morfológica foi constatada durante as subculturas.

Em um estudo realizado com *Dendrobium*, Cruz et al. (2019) descreveram proliferação contínua de corpos semelhantes a protocormos (CSP) por 15 subculturas sucessivas, ocorridas a cada 60 dias. No entanto, a obtenção de CSP neste estudo remete à via embriogênica, e não à via organogênica, pela qual as plantas foram obtidas neste estudo. Não foi verificada presença de CSPs, que denotassem a ocorrência de embriogênese somática para *C. elongata* durante nenhuma etapa do trabalho.

### *Estabilidade genética*

A análise de sete indivíduos (um por geração) de cada um dos 19 genótipos que atingiram a sétima geração, com seis primers de ISSR, resultou na detecção de 73 *loci* não ambíguos, gerando 7973 bandas legíveis, que variaram de 200 a 1600 pares de base. O número

de bandas por primer variou de 10 (MAO) a 14 (MANNY), com média de 12,16 bandas/primer. Dentre os seis primers utilizados apenas o UBC 844 não foi eficiente na detecção de eventos de VS, sendo o UBC 901 o que mais apontou *loci* polimórficos entre os indivíduos do mesmo genótipo, ou seja, a ocorrência de VS (Tabela 2).

**Tabela 2-** Relação dos primers utilizados e número de *loci* polimórficos para *C. elongata*

Primer	Número de <i>loci</i>	Número de <i>loci</i> polimórficos
AW3	13	1
MANNY	14	2
MAO	10	1
UBC 844	12	0
UBC 898	12	2
UBC 901	12	4
<b>Média</b>	12,16	1,66

Dos 19 genótipos analisados foi observada instabilidade genética em sete (1, 3, 8, 10, 11, 14, e 18), correspondendo a 36,8%. Portanto, as plantas mãe e respectivos brotos, obtidos em todas as gerações, pertencentes aos genótipos 2, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 15, 16, 17, 19 e 20 são 100% idênticos geneticamente. Para os demais, nos quais foi detectada a ocorrência de VS, a similaridade genética máxima, mínima e média entre a planta mãe e clones correspondentes, são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3-** Similaridade genética máxima (Sma), mínima (Smi) e média (Sme) entre as plantas mãe de *Cattleya elongata* e seus respectivos clones que apresentaram instabilidade genética.

Parâmetros avaliados	Genótipo						
	C1	C3	C8	C10	C11	C14	C18
Mma (%)	96,8	98,33	100	100	100	100	100
Smi (%)	96,8	98,33	98,4	98,4	98,4	98,33	94,9
Sme (%)	99,8	99,5	99,5	99,2	99,2	99,04	97,4

Valores apresentados em percentuais.

Embora uma porcentagem significativa dos genótipos trabalhados tenha sido afetada pela VS, uma alta similaridade genética entre plantas mãe e regenerantes foi constatada (Tabela 3). A maioria da VS deriva de plantas regeneradas a partir de culturas que tenham perpassado por uma fase de morfogênese indireta (Mosqueda e Andreu 2015; Cao et al. 2016; Thorat et al.

2018). Já plantas derivadas de meristemas organizados, detém maior estabilidade genética durante a diferenciação *in vitro* (Shenoy e Vasil 1992; Thorat et al. 2018).

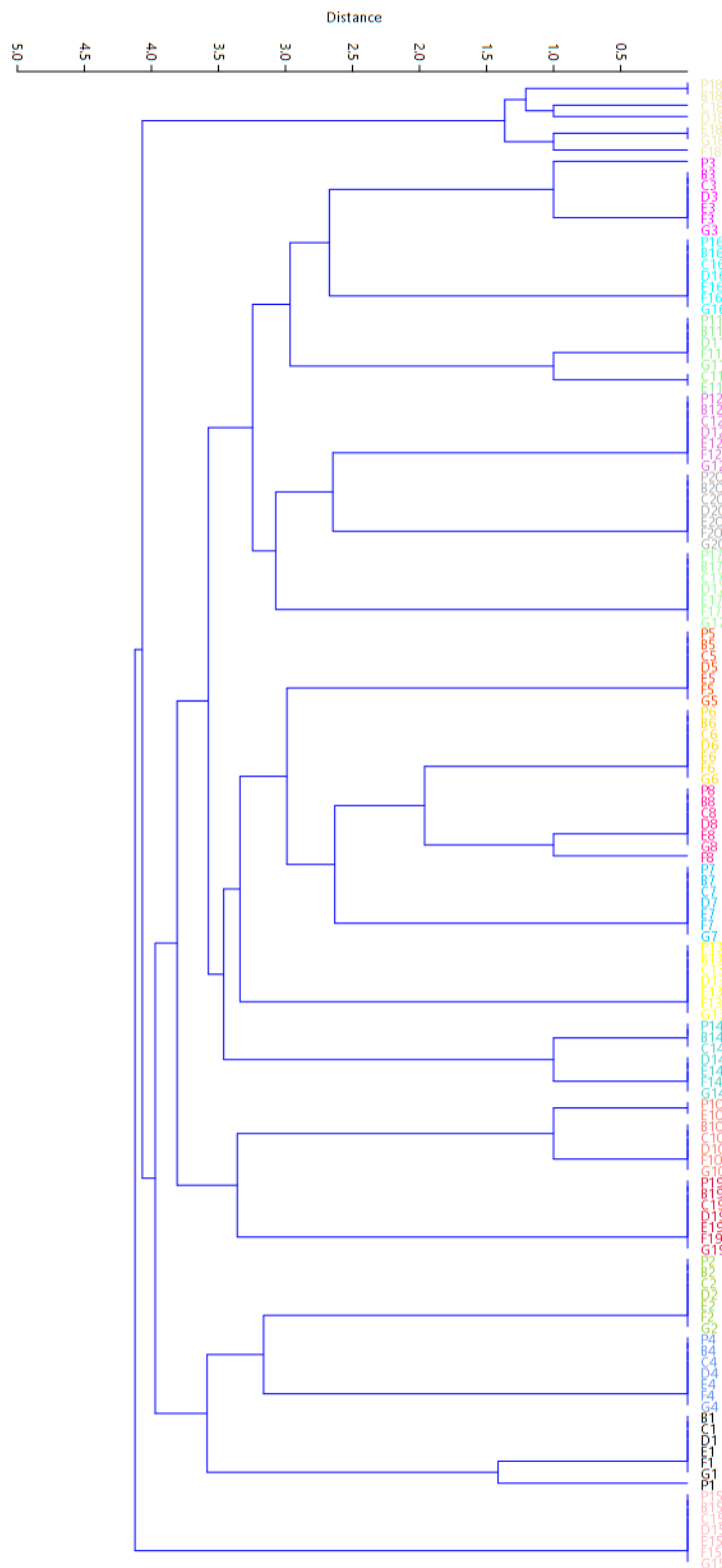
A estabilidade genética em plantas obtidas a partir da organogênese direta parece ser a regra na micropropagação (Bhowmik et al. 2016; Rathore et al. 2016; Jiang et al. 2018; Quiala et al. 2018; Thorat et al. 2018). Thorat et al (2018) verificaram que plantas de cana de açúcar obtidas através de organogênese direta não mostraram qualquer VS, enquanto plantas derivadas de calos mostraram polimorfismo em 4,54% dos *loci* analisados. A orquídea *Anoectochilus formosanus*, apresentou brotos advindos de organogênese direta com mais de 94% de similaridade genética mesmo após cinco anos de subculturas realizadas a cada 90 dias (Zhang et al. 2010).

Tendo em vista que todas as plantas obtidas neste estudo foram geradas através da ativação de gemas axiais, via organogênese direta, baixas taxas de VS eram esperadas para as mesmas. No entanto, a VS ainda é passível de detecção em plantas obtidas por essa via, como relatado para a orquídea *Anoectochilus elatus* Lindl., que apresentou baixos índices de polimorfismo (Sherif et al. 2017).

O uso de reguladores vegetais tende a aumentar as chances de variações genéticas em orquídeas (Khoddamzadeh et al. 2010; Mosqueda e Andreu 2015; Chin et al. 2019). Neste caso, a perda da fidelidade genética pode estar associada com dois fatores distintos. O primeiro ocorre quando o regulador vegetal promove a multiplicação celular a tal ponto que a mitose ocorre antes mesmo da duplicação do material genético total, gerando células filhas com genótipos diferentes dos da célula mãe. O segundo ocorre quando o próprio regulador vegetal funciona como um agente mutagênico (Krishna et al. 2016). A não utilização deste tipo de agente neste trabalho pode ter contribuído para a alta similaridade genética, mesmo entre as plantas que apresentaram VS.

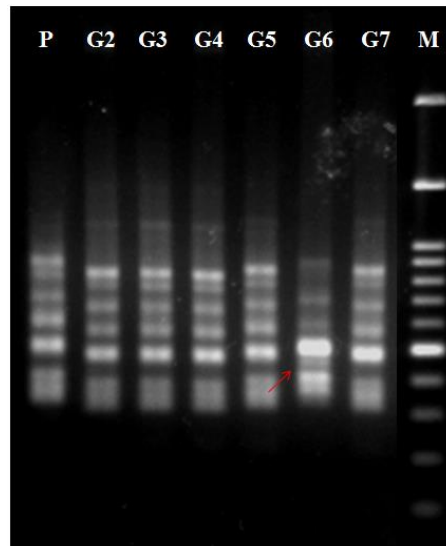
Em estudo inédito, Chin et al. (2019) relataram que o uso de carvão ativado no meio de cultura reduziu a taxa de VS para a *Dendrobium*. Tal efeito advém de sua capacidade adsorvente de substâncias inibitórias no meio de cultura, o que reduz parte do estresse associado à multiplicação *in vitro*, acarretando minimização dos riscos de alterações genéticas (Chin et al. 2019). O uso deste componente no meio de cultura durante a micropropagação de *C. elongata* pode ter tido efeito similar na manutenção da estabilidade genética da espécie.

Apesar da VS ser detectada, a análise de cluster demonstrou que a similaridade genética dentro dos genótipos ao longo das subculturas foi maior do que a presente entre os genótipos (Figura 2), uma vez que todos os indivíduos do mesmo genótipo agruparam-se primeiramente entre si e após com grupos formados pelos representantes de outros genótipos. No entanto, a ocorrência de *loci* polimórficos intraclonais, em plantas que apresentaram VS, fez com que, em determinados momentos, brotos derivados de subculturas não diretamente relacionadas apresentassem maior similaridade geneticamente entre si do que quando comparados a brotos derivados de subculturas diretamente relacionadas. Para o genótipo 18, por exemplo, o clone E18, pertencente à quinta geração de subcultivo, foi mais similar ao clone G18, procedente da sétima geração, do que ao clone F18, derivado diretamente de E18. O mesmo fenômeno também foi observado nos genótipos 10 e 11, em decorrência de VS.



**Figura 2-** Dendrograma mostrando a similaridade genética entre as plantas mãe de *Cattleya elongata* (P) e seus respectivos clones (B, C, D, E, F e G) após seis eventos subsequentes de multiplicação *in vitro*. O dendrograma foi gerado a partir da análise da matriz de dados de ISSR com algoritmo UPGMA e índice de similaridade genética de Jaccard. Cada genótipo foi diferenciado por uma cor e número diferente.

Em quatro genótipos afetados pela ocorrência de VS (8, 10, 11 e 18) foi possível observar a presença de determinados locus que “desapareciam” por uma geração e ocorriam novamente nas subseqüentes (Figura 3). A explicação proposta para esse fenômeno baseia-se na possibilidade de formação de quimeras *in vitro* (López et al.2004; Preiner et al. 2019).

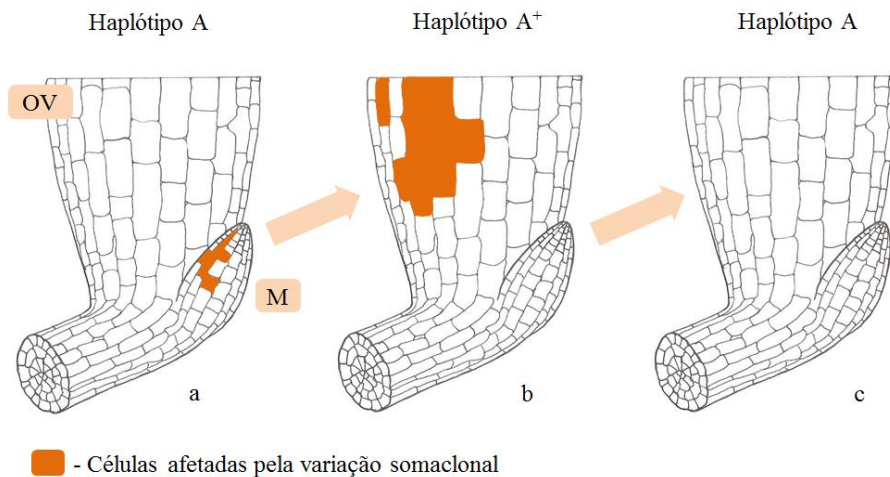


**Figura 3-** Gel de agarose 1,6% mostrando os haplótipos do genótipo 8 de *Cattleya elongata*, ao longo de sete gerações de subcultivo, amplificadas com primer UBC898. P- Primeira geração, G2- Segunda geração, G3- terceira geração, G4- quarta geração, G5- quinta geração, G6- sexta geração, G7- sétima geração, M- marcador de peso molecular de 100pb. Seta vermelha indica *locus* polimórfico.

O quimerismo é definido como um tipo específico de mosaicism, onde células com diferentes genótipos localizam-se concomitantemente no meristema apical (Marcotrigiano, 1997). Existem três tipos de quimeras, que são classificadas de acordo com a dimensão da zona ocupada por células mutantes no meristema apical. São elas as quimeras sectoriais, periclinais e as mericlinais (Marcotrigiano 1997; Datta 2020). Quimeras mericlinais existem quando uma fração de uma ou mais camadas de células constituintes do meristema são diferentes do restante da camada (Marcotrigiano, 1997). Esse tipo de quimera é particularmente instável, podendo hora gerar tecidos quiméricos, hora não quiméricos (Marcotrigiano 1997; Datta 2020).

A presença de um *locus* presente em uma geração que “desaparece” na subseqüente é compatível com o que se esperaria de uma quimera mericlinal, onde a genótipos diferentes podem se manifestar em momentos diferentes. Neste cenário, um padrão de bandas variável e passível de reversão é plausível ao longo do desenvolvimento do explante (Figura 4). Desta forma, uma planta com Haplótipo hipotético “A” sofreria VS em uma porção de suas células

meristamáticas (Figura 4a). Tal meristema daria origem aos órgãos vegetativos dos brotos durante o próximo ciclo de multiplicação, ocasionando a detecção do haplótipo mutante “A<sup>+</sup>” (Figura 4b). No entanto, devido ao caráter instável das quimeras mericlinais, as células portadoras de VS, antes presentes no meristema, agora não ocorrem mais nestes tecidos (Figura 3b), fazendo com que os botos advindos do próximo ciclo de multiplicação apresentem mais uma vez o haplótipo não mutado “A” (Figura 4c).



**Figura 4** – Alterações passíveis de reversão em haplótipo de quimera mericlinal. OV- Órgão vegetativo, M - Meristema, a- Planta com órgão vegetativo de haplótipo “A” e pequena porção do meristema afetada por VS, b- Planta com órgão vegetativo de haplótipo “A<sup>+</sup>” e meristema sem VS, c- Planta retoma haplótipo “A”, não possuindo órgão vegetativo ou meristema afetado por VS.

A formação de quimeras *in vitro* deve necessariamente ter como precursor um evento de VS. Por tanto, é possível dizer que VS foi detectada na parcela de plantas que apresentou quimerismo (21%). No entanto esses eventos específicos de VS parecem não ter se fixado, fazendo com que a VS nestes casos fosse pontual. Segundo Datta e Chakrabarty (2009), muitos padrões inéditos de formas e cores são perdidos em vegetais devido ao caráter quimérico dos mesmos, o que torna difícil a fixação do padrão. É possível, portanto, traçar um paralelo com a micropropagação, em que determinadas células e/ou tecidos que passem a apresentar VS são eventualmente perdidas.

A detecção de quimeras pode ser realizada com sucesso a partir de técnicas como a contagem cromossômica (Nassar e Bomfim 2013) e a cariotipagem (Yang et al. 2015; De et al. 2019). No entanto estas técnicas são incapazes de detectar quimeras que portem alterações genéticas de menor escala, como mutações de ponto, ou pequenas deleções e inserções, por exemplo. Desta forma, passou-se a empregar marcadores moleculares que possibilitam a

análise ampla do genoma, os quais permitem a detecção de mutações de menor escala. O marcador mais comumente utilizado para este fim é o SSR (Bertsch et al. 2005; Zhang et al. 2007; Stenkamp et al. 2009; Preiner et al. 2019). A codominância do SSR possibilita a detecção de dois haplótipos concomitantes em uma única amostra. Quimeras obtidas *in vitro* também são passíveis de detecção a partir de marcadores moleculares SSR, como é relatada com sucesso para culturas como cacau e uva (López et al. 2004; Preiner et al. 2019).

Bertsch et al. (2005) também relatam uso de marcadores SSR para determinar a dinâmica do quimerismo periclinal em explantes *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 *in vitro*. Os autores constataram que o caráter quimérico da cultivar era mantido em plantas obtidas através da organogênese, no entanto tal caráter foi perdido em plantas advindas da embriogênese somática. Embora um padrão para a resposta morfogênica possa ser traçado em quimeras periclinais, é difícil estabelecer tais padrões para as quimeras mericlinais propostas para *C. elongata*.

Apesar do marcador codominante SSR ser comumente empregado para detecção de quimeras, os marcadores dominantes ISSR empregados neste estudo também possibilitaram a detecção do quimerismo. A natureza dominante deste marcador molecular não permite dizer se células de haplótipos distintos ocorrem concomitantemente em um mesmo tecido a partir de uma única amostra. No entanto, a comparação entre amostras provenientes de subcultivos sucessivos realizada neste estudo abriu precedentes para que os marcadores ISSR pudessem ser usados para este fim. Apesar desta limitação, o uso de marcadores dominantes para detecção de quimeras possui aplicabilidade, como relatado para o RAPD (Sugawara et al. 1995; Olmos et al. 2002). Através do marcador RAPD, Sugawara et al. (2002) conseguiram determinar quais as camadas de células que diferiam entre si em quatro quimeras periclinais para *Citrus*, reforçando a aplicabilidade destes marcadores.

Palomino et al. (1999), verificaram que porções de células diferenciadas podem apresentar mutações enquanto os tecidos meristemáticos permanecem estáveis *in vitro*. Este cenário se enquadra ao que Marcotrigiano (1997) define como variação, onde diferentes genótipos coexistem em um único organismo, afetando ou não seu fenótipo. Desta forma, a ocorrência de subpopulações de células mutadas também gera um mosaico que pode explicar a reversão de mutações observadas para *C. elongata* ao longo dos ciclos de multiplicação.

Há ainda a possibilidade de que linhagens de células portadoras de VS possuam *fitness* reduzido em função do possível caráter deletério da mutação, sendo menos aptas a se



multiplicar, por exemplo. Neste cenário de células com diferentes genótipos em um mesmo organismo, a mutação deletéria, embora passível de detecção em um primeiro momento, tenderá a deixar de existir, pois as células portadoras da mesma seriam menos aptas quando comparadas às demais (Wang e Wang 2002). Tal cenário se torna mais plausível quando pensamos no caráter deletério que a maioria das mutações representa, o que tende a tornar sua fixação difícil (Eyre-Walker et al. 2002).

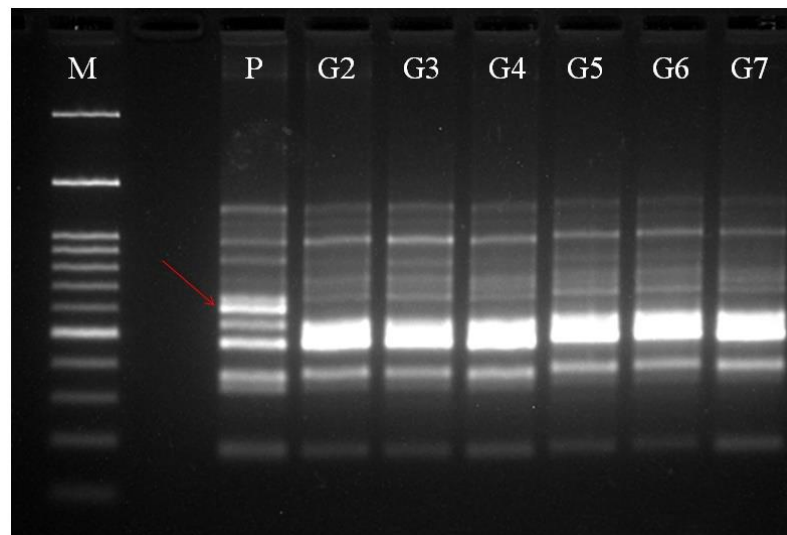
Atualmente, quimeras são fontes de variação altamente aplicadas ao mercado florístico (Datta e Chakrabarty 2009). Desta forma, é possível supor que quimeras geradas através da VS, como as descritas para *C. elongata*, possam encontrar aplicabilidade no mercado florístico, quando devidamente isoladas através de microtécnicas que possibilitem a produção de mutantes puros através da dissociação do quimerismo.

Dentre as plantas mais afetadas pela VS, estão as do genótipo 1, com dois *loci* polimórficos e o genótipo 18, com três *loci* polimórficos (Tabela 4). Isso rendeu a esses genótipos os valores mínimos de similaridade genética ente plantas mãe e regenerantes de 96,8% e 94,9% (Tabela 3) respectivamente, acarretando no surgimento dos brotos mais afetados pela VS neste estudo. Estes mesmos genótipos (1 e 18) acumularam cinco dos 10 *loci* polimórficos encontrados neste estudo (Tabela 4), revelando a suscetibilidade de genótipos específicos a mutações para a espécie. O genótipo é comumente tido como um fator que influi nas taxas de VS (Bairu et al. 2011) tal como visto para culturas como café e azeitona (Etienne e Bertrand 2003; Bradaï et al. 2019). Portanto, o genótipo é um fator de forte influência na estabilidade genética de *C. elongata* durante a micropropagação.

**Tabela 4** – Relação do número de *loci* polimórficos nos genótipos de *Cattleya elongata* que apresentaram VS, em cada geração de subcultivo.

Genótipo com VS	Gerações						
	P	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	-	2	-	-	-	-	-
3	-	1	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	1	-
10	-	-	-	-	1	-	-
11	-	-	1	-	-	-	-
14	-	-	-	1	-	-	-
18	-	-	2	-	1	-	-

Para os demais genótipos afetados pela VS (3, 8, 10, 11 e 14), apenas um *locus* polimórfico foi detectado entre plantas mãe e as plantas regenerantes (Tabela 4). Foi constatado que 30% da VS detectada neste estudo ocorreu durante a segunda geração de subcultivo (G2), 30 % na geração 3 (G3), 10% em G4, 20% na quinta geração (G5) e 10% em G6 (Tabela 4). Portanto, 70% da variação total detectada neste estudo ocorreu antes da quinta geração de subcultivo, sendo que 30% da mesma se deu durante a segunda geração de subcultivo, como ilustrado na Figura 5. Desta forma, a espécie parece ser mais suscetível à VS até a terceira geração.



**Figura 5**- Gel de agarose 1,6% mostrando os haplótipos do genótipo 1de *Cattleya elongata*, ao longo de sete gerações, amplificadas com primer MANNY. P- Primeira geração, G2- Segunda geração, G3-terceira geração, G4-quarta geração, G5-quinta geração, G6-sexta geração, G7-sétima geração, M- marcador de peso molecular de 100pb. Seta vermelha indica *locus* polimórfico.

A ocorrência de VS a partir da segunda geração de subcultivo (G2) neste estudo fornece indícios de que este fenômeno pode ocorrer muito precocemente durante a micropropagação da espécie. Também constatou-se que o aumento no número de subcultivos provocou o acúmulo

de *loci* polimórficos em pelo menos um genótipo (18), além de influenciar no aumento no número de genótipos afetados ao longo do tempo (Tabela 4). Por tanto, *C. elongata* parece suscetível à VS desde estágios iniciais da micropropagação, e o aumento no número de subculturas possibilita que um maior número de genótipos sejam afetados.

Tal resultado é altamente incomum, pois geralmente a VS é detectada a partir da quinta subcultura (G6 neste estudo), tendendo a aumentar progressivamente ao longo dos ciclos de multiplicação para banana e hibisco (Rodrigues et al. 1997; Santos e Rodrigues 2004; Konar et al. 2019). Esta tendência também se repete em orquídeas, como descrito para híbridos de *Dendrobium*, onde nenhum *locus* polimórfico foi encontrado após seis subcultivos sucessivos (Ferreira et al. 2006). Embora *loci* polimórficos não tenham sido observados, os autores relatam que cerca de 5% das plantas obtidas apresentaram fenótipo alterado, o que é atribuído à VS de fonte epigenética.

No entanto, Liu et al. (2005) relataram um achado contrastante. Apesar dos autores não terem detectado VS até o terceiro subcultivo de *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, os mesmos verificaram a ocorrência de *loci* polimórficos através do uso de marcadores RAPD a partir do quarto subcultivo. Tal dado mostra que orquídeas podem apresentar VS precocemente durante a micropropagação, entretanto, a ocorrência de VS para *C. elongata* a partir da segunda subcultura parece ser o registro mais precoce do fenômeno para orquídeas.

Assim como descrito por Liu et al. (2005) para *D. officinale*, plantas micropropagadas de *Phalaenopsis gigantea* J. J. Sm. se mantiveram estáveis geneticamente até a terceira subcultura (Samarfard et al. 2014). No entanto, plantas advindas do quarto subcultivo apresentaram 5% de dissimilaridade genética quando comparadas às plantas mãe. Os autores também constataram um aumento significativo da VS (20% de dissimilaridade genética) a partir deste ponto. Embora a VS tenha ocorrido cedo durante a micropropagação de *C. elongata*, taxas tão altas de VS não foram constatadas em nenhum momento do estudo.

### **Considerações Finais**

A taxa de multiplicação *in vitro* de *C. elongata* mantém-se estável até o sétimo subcultivo sem alteração morfológica nas plantas geradas ao longo dos ciclos de multiplicação. A oxidação fenólica do explante rizoma é um fator limitante a propagação *in vitro* de *C. elongata*. O genótipo e o número de subcultivos parecem influenciar a ocorrência de VS em

*C. elongata*. Uma nova hipótese baseada na possibilidade de ocorrência de quimeras *in vitro* pode justificar a variação do haplótipo ao longo dos subcultivos. *Loci* polimórficos foram encontrados a partir da segunda geração de subcultivo para a espécie.

## Referências

Ahmad I, Hussain T, Ashraf I et al (2013) Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 13:539-547.

Alhani MC, Wilkinson MJ (1998) Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding* 117:573-575.

Azevedo CO, van den Berg C (2007) Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus, Série Ciências Biológicas* 7:199-210.

Barden KA, Smith SS, Murakishi HH (1986) Regeneration and screening of tomato somaclones for resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Science* 45:209-213.

Bertsch C, Kieffer F, Maillot P et al (2005) Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. *BMC Plant Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-20>

Bhowmik SSD, Basu A, Sahoo L (2016) Direct shoot organogenesis from rhizomes of medicinal Zingiber *Alpinia calcarata* Rosc. and evaluation of genetic stability by RAPD and ISSR markers. *Journal of crop science and biotechnology* 19:157-165.

Bradaï F, Sánchez-Romero C, Martín C (2019) Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. *Scientia Horticulturae* 251:260-266.

Cao Z, Sui S, Cai X et al (2016) Somaclonal variation in 'Red Flash' caladium: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126: 269-279.

Chin CK, Lee ZH, Mubbarakh SA et al (2019) Effects of plant growth regulators and activated charcoal on somaclonal variations of protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium* Sabin Blue orchid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22:101426.

CITES (2017) Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices II. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>. Accessed in 15 June 2019

Civatti LM, Marchi MNG, Schnadelbach AS, Bellintani MC (2017) *In vitro* multiplication and genetic stability of two species of *Micranthocereus* Backeb.(Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*131:537-545.

Chaturvedi HC, Jain M (1994) Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture of *Digitalis purpurea*. *Plant cell, tissue and organ culture* 38:73-75.

Chugh S, Guha S, Rao IU (2009) Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122: 507-520.

Conceição AA, Giuliatti AM (2002) Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Hoehnea* 29: 37-48.

Cruz DD, Borba EL, van den Berg C. (2003) O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no estado da Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 3:26-34.

Cruz AE, Ramanathan N, Gilbert EL (2019) Effects of explant type on *in vitro* culture of *Dendrobium* cv. Sonia. *International Journal of Agriculture, Forestry and Plantation* 8: 5p. Disponível em: [http://ijafp.com/wp-content/uploads/2019/10/KLIAFP8\\_066.pdf](http://ijafp.com/wp-content/uploads/2019/10/KLIAFP8_066.pdf)

Datta SK, Chakrabarty D (2009) Management of chimera and *in vitro* mutagenesis for development of new flower color/shape and chlorophyll variegated mutants in *Chrysanthemum*. *Inducted plant mutations in the genomics era* 303-305.

Datta SK (2020) Induced mutations: technological advancement for development of new ornamental varieties. *Nucleus*. <https://doi.org/10.1007/s13237-020-00310-7>.

De KK, Pal T, Mondal A et al (2019) Extended centromere and chromosomal mosaicism in some varieties of grass pea, *Lathyrus sativus* L. *The Nucleus* 62: 21-30.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Etienne H, Bertrand B (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology* 23:419-426.

Eyre-Walker A, Keightley PD, Smith NG, Gaffney D (2002) Quantifying the slightly deleterious mutation model of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution* 19:2142-2149.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia* 35:1039-1042.

Ferreira WDM, Kerbauy GB, Costa APP (2006) Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42:568-571.

Flores R, Maldaner J, Nicoloso FT (2006). Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Ciência Rural* 36:845-851.

Flores R, Stefanello S, Franco ET, Mantovani N (1998) Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência* 4: 201-205.

Giulietti AM, Menezes, NL, Pirani JR et al (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 1-151.

Giulietti AM, Queiroz LD, Harley RM (1996) Vegetação e flora da Chapada Diamantina, Bahia. *Anais da 4ª Reunião Especial da SBPC*, Feira de Santana: 144-156.

Gopi C, Vatsala TM, Ponmurugan P (2006) *In vitro* multiple shoot proliferation and plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.-A commercial spicy orchid. *Journal of Plant Biotechnology-Daejeon* 8:37-41.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:9.

Hsu TW, Tsai WC, Wang DP et al (2008). Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis* Hsiang Fei cv. HF and its somaclonal variant. *Plant Science* 175(3): 415-422.

Ishii Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 17: 446-450.

Jakobsone G, Osvalde A (2019) Peculiarities of calcium and iron effects on some wild terrestrial orchids *in vitro* compared to *in vivo*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 55: 121-131.

Jiang W, Hua S, Zhou X et al (2018) Assessment of genetic stability and analysis of alkaloids potential in micropropagated plants of *Croomia japonica* Miquel, an endangered, medicinal plant in China and Japan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 135:1-12.

Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol.* <https://doi.org/10.1023/A:1006423110134>

Kaewubon P, Hutadilok-Towatana N, Silva JAT et al (2015) Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 121: 53-69.

Kako S (1973) Clonal propagation of *Cattleya* through shoot meristem culture. *Japan Agricultural Research Quarterly* 7:109-115.

Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Kadir MA et al (2010) Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology* 9:6632-6639.

Konar S, Adhikari S, Karmakar J, Ray A, Bandyopadhyay TK (2019) Evaluation of subculture ages on organogenic response from root callus and SPAR based genetic fidelity assessment in the regenerants of *Hibiscus sabdariffa* L. *Industrial crops and products* 135:321-329.

Krishna H, Alizadeh M, Singh D et al (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6:54.

Kumar DR, Kumar SA (2014) Tissue Culture Techniques and Applications for Mass Production of Nucellar Plants of *Citrus karna*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 3: 2319-8753.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics* 60:197-214.

Liu SQ, Li XJ, Yu QB, Zhou GY (2005) Study on hereditary stability for *Dendrobium officinale* et Migo of different descends. *J South Yangtze Univ (Nat Sci Ed)* 4:518-521.

López CMR, Wetten AC, Wilkinson MJ (2004) Detection and quantification of *in vitro*-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* (L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110:157-166.

Marcotrigiano M (1997) Chimeras and variegation: patterns of deceit. *HortScience* 32: 773-784.

Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Salinas-Ruíz J et al (2017) Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 53:553-560.

Minamiguchi JY, Machado Neto NB (2007) Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*: Orchidacease. *Colloquium Agrariae* 3:7-13.

Mosqueda MAR, Andreu LGI (2015) Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123:657-664.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.

Nassar NM, Bomfim N (2013) Synthesis of periclinal chimera in cassava. *Genetics and molecular research* 12:610-617.

Olmos SE, Lavia G, Di Renzo M et al. (2002) Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38:617-622

Palomino G, Dolezel J, Cid R et al (1999) Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. *Plant Science* 141:191-200.

Phillips GC (2004). *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40:342-345.

Preiner D, Marković Z, Šikuten I et al (2019) *In vitro* synthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) intraspecific chimeras using meristematic bulk tissue grafting. *Scientia Horticulturae* 246: 965-970.

Quiala E, Chong-Pérez B, Rojas L et al (2018) Efficient direct shoot organogenesis, genetic stability and secondary metabolite production of micropropagated *Digitalis purpurea* L. *Industrial Crops & Products* 116: 259-266.

Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S et al (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:16-24.

Rathore MS, Mastan SG, Yadav P et al (2016) Shoot regeneration from leaf explants of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal and genetic stability evaluation of regenerates with RAPD and ISSR markers. *South African Journal of Botany* 102:12-17.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1): 9-17.

Rodrigues PHV (2008) Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae). *Scientia Agricola* 65:681-684.

Rodrigues PHV, Tulmann Neto A, Cassieri Neto P, Mendes BMJ (1997) Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated nanicao (*Musa* spp., AAA Group). In *II International Symposium on Banana: I International Symposium on Banana in the Subtropics* 490:469-474.

Rubluo A, Marín-Hernández T, Duval K, Vargas A, Márquez-Guzmán J (2002) Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia horticulturae* 95:341-349.

Santos CCCD, Rodrigues PHV (2004) Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. *Bragantia* 63:201-205.

Samarfard S, Kadir MA, Kadzimin S B et al (2014) *In vitro* propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thidiazuron combinations. *HortScience* 49:82-88.

Seeni S, Latha PG (1992) Foliar regeneration of the endangered red vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29:167-172.



Seeni S, Latha PG (2000) *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:1-8.

Shahzad A, Parveen S, Sharma S et al (2017) Plant tissue culture: Applications in plant improvement and conservation. In: Abdin M, Kiran, U, Kamaluddin, A A (Eds.) *Plant Biotechnology: Principles and applications*. Springer: Singapura, p. 37-72.

Sherif NA, Kumar TS, Rao MV (2017) *In vitro* propagation and genetic stability assessment of an endangered terrestrial jewel orchid *Anoectochilus elatus* Lindl. *Indian journal of experimental biology* 55:853-863.

Shenoy VB, Vasil IK (1992) Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theoretical and Applied Genetics* 83:947-955.

Silva JP, Costa MKC, Araújo MRS et al (2018). Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (bap) sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Rosa* sp. *Revista Agroecossistemas* 9: 370-380.

Stenkamp SH, Becker MS, Hill BH et al (2009). Clonal variation and stability assay of chimeric Pinot Meunier (*Vitis vinifera* L.) and descending sports. *Euphytica* 165:197.

Sugawara K, Oowada A, Moriguchi T, Omura M (1995) Identification of *Citrus* chimeras by RAPD markers. *HortScience* 30: 1276-1278.

Sugawara K, Wakizuka T, Oowada A et al (2002) Histogenic identification by RAPD analysis of leaves and fruit of newly synthesized chimeric Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:104-107.

Suzuki RM, Ferreira WM (2007) Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais* 1: 655-659.

Thorat AS, Sonone NA, Choudhari VV et al (2018) Plant regeneration from direct and indirect organogenesis and assessment of genetic fidelity in *Saccharum officinarum* using DNA-based markers. *Bioscience Biotechnology Research Communications* 11:60-69.

Viana CM (2013) Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata* Barb. Rodr.(Orchidaceae Juss.).Dissertação, Universidade Federal da Bahia.

Wang QM, Wang L (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant cell reports* 31:1535-1547.

Yang F, Li L, Rong E et al (2015) Karyotype analysis of obtained tetraploid in medicinal plant (*Platycodon grandiflorus*). *J Med Plants Res* 9:294-300.

Żabicki P, Sliwinska E, Mitka J et al (2019) Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic

studies of *in vitro* propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit.(Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136: 339-352.

Zhang F, Lv Y, Dong H, Guo S (2010) Analysis of genetic stability through Intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* H AYATA, a medicinal plant. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33:384-388.

Zhang M, Deng X, Qin C et al (2007) Characterization of a new natural periclinal navel–Satsuma chimera of *Citrus*:‘Zaohong’navel orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132:374-380.

## CAPÍTULO 2

**GENETIC STABILITY OF *CATTLEYA ELONGATA* BARB. RODR.  
(ORCHIDACEAE) IN PROPAGATION VIA INDIRECT ORGANOGENESIS**

Artigo a ser submetido ao periódico *PLANT CELL REPORTS*

## RESUMO

*Cattleya elongata* é endêmica das regiões de campos rupestres da Chapada Diamantina-BA e, devido ao elevado valor ornamental, é vítima do extrativismo predatório. Neste contexto, a cultura de tecidos possibilita a produção em larga escala de plantas em tempo e espaços reduzidos. No entanto os calos, frequentemente visados em protocolos de multiplicação, tendem a promover variação somaclonal (VS), comprometendo a fidelidade genética das plantas produzidas. O objetivo deste estudo foi detectar a ocorrência de VS, através de marcadores ISSR, durante a formação e diferenciação de calos em *C. elongata* e caracterizar a via morfogênica que rege formação de brotos a partir destes. Para tal, os rizomas de 520 plantas foram inoculados em meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações salinas, acrescido de inositol, solução F carvão ativado e 6g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 e o mesmo foi autoclavado por 15 min a 121°C e 1,5 atm. A análise anatômica dos tecidos se deu através de sua fixação em FAA, desidratação em série alcóolica crescente e posterior emblocamento em resina histológica sintética. O material foi seccionado e corado com azul de toluidina a 0,05%. A extração do DNA se deu a partir de um grama de tecido e sua amplificação ocorreu por reação de PCR com sete primers ISSR (AW3, CHRIS, MANNY, MAO, UBC 844, UBC 898 e UBC 901). O produto das reações foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (1.6 %) e corado com Gelred®. Ao final de 90 dias, observou-se uma taxa de 5,38% para formação de calos, dos quais três foram destinados à análise anatômica, 23 à análise genética e outros dois para a regeneração de brotos que seriam analisados geneticamente. O surgimento de brotos a partir de calos se deu através da organogênese indireta, sem a necessidade do uso de reguladores vegetais. As análises genéticas mostraram que cerca de 26% dos genótipos analisados neste estudo apresentaram VS na fase de calo. A susceptibilidade de genótipos específicos a eventos de variação somaclonal foi observada. Os calos destinados à diferenciação geraram 103 de brotos. Estes brotos apresentaram 61 loci, não havendo a detecção de polimorfismo para nenhum dos mesmos. A ausência de VS em brotos provindos de calos sugere a um efeito deletério sobre a capacidade de diferenciação dos tecidos em brotos. Esse fenômeno seria análogo a um efeito gargalo, que impede que células portadoras de VS originem tecidos diferenciados.

**Palavras chave:** Calos, Efeito gargalo, Genótipo, ISSR, organogênese indireta, Variação somaclonal.

**GENETIC STABILITY OF *CATTLEYA ELONGATA* BARB. RODR.  
(ORCHIDACEAE) IN PROPAGATION VIA INDIRECT ORGANOGENESIS**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil;

<sup>2</sup> Instituto Federal Baiano, Campus Catu, Bahia, Brasil;

<sup>3</sup> Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil.

Corresponding author- Gustavo Surlo Nascimento

E-mail: [gustavosurlo@gmail.com](mailto:gustavosurlo@gmail.com),

Telephone: +55(71)993993656

**Abstract** - *Cattleya elongata* is endemic to the campos rupestres areas at Chapada Diamantina - BA and, as a result of its high ornamental value, suffer from predatory extractivism. In this context, the vegetal tissues culture enables the large-scale production of plants in reduced time and space. However, callus, often targeted in multiplication protocols for enabling the production of many plants, tend to promote somaclonal variation (SV), that can compromise the genetic fidelity of produced plants. The aim of this study was to detect the occurrence of SV using ISSR markers, during callus formation and differentiation in *Cattleya elongata* and characterize the morphogenetic pathway that governs sprouts formation from these. Here we show that the emergence of callus and the shoots regeneration via indirect organogenesis in free plant regulators medium. DNA amplification was performed through seven ISSR markers, showing that about 26% of analyzed genotypes in this study were affected by SV during the callus phase. The susceptibility of specific genotypes to events of SV was observed. The callus used for differentiation generated 103 shoots. These shoots showed 61 *loci*, and no polymorphism was detected between them. The absence of SV in regenerated shoots can suggest the actuation of a bottleneck effect that prevents SV-carriers cells from producing differentiated tissues.

**Keywords:** Callus, Bottleneck effect, Genotype, ISSR, Indirect organogenesis, Somaclonal variation.

**Key message** – Callus in *C. elongata* have high rates of somaclonal variation, but this variation does not occur in callus regenerated sprouts, as result of a possible bottleneck effect at cellular level.

**Acknowledgments** – This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - finance Code 001 and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). We would like to thank the Universidade Federal da Bahia and Universidade Estadual de Feira de Santana for the technical support.

## Introduction

Notable evolutionary innovations, such as acquisition of CAM metabolism, pollination by deception and mandatory association with mycorrhizal fungi for germination, have made Orchidaceae the largest family within Angiosperms (Givnish et al. 2016). The family has about 880 genera and 27,000 species, covering about 8% of the planet's vascular plants (Givnish et al. 2016).

One of the genera belonging to the Orchidaceae is *Cattleya* Lindl., which houses 114 species (van den Berg 2014). Due to the high ornamental value, many *Cattleyas*, suffer from predatory extractivism, such as *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Cruz et al. 2003), which is included on appendix II of Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora (CITES 2019).

*C. elongata* grows over rocks, has big red-brown flowers, magenta lip and blooms between January and May. The species is endemic of central portion of Chapada Diamantina, where it grows on vegetative type called campos rupestres (Cruz et al. 2003). The campos rupestres occur above 900m height, and although they have poor soils, they harbor a large number of plant species, many of which are endemic (Giulietti et al. 1996; Rapini et al. 2008). Despite its ecological importance, this environment has been reduced as a result of anthropic action (Rapini et al. 2008).

Due to slow vegetative propagation, fungal dependent germination, and the highly specialized long-life cycle typical of orchids (Ferreira and Suzuki 2008), tissue culture is a valuable tool for conservation of Orchidaceae. With this technique, the cellular totipotency can be resumed, enabling the production of unlimited number of plants with high phytosanitary quality, in reduced time and space (Suzuki and Ferreira 2007; Shahzad et al. 2017).

Once totipotent cells have been cultivated *in vitro*, they can differentiate in a process known as morphogenesis. Morphogenesis can occur through two ways, organogenesis and embryogenesis, both of which can happen directly (without callus) or by indirect (with callus) routes (Phillips 2004). During embryogenesis, somatic cells generate embryos analogous to zygotic, but shoots arise from somatic tissues in organogenesis (Phillips 2004).

Plants produced by tissue culture result only from mitotic cell division, so they were thought to be always clones of the base material used as explant (Larkin 1998). However, occasionally genetic or phenotypic variations in plants obtained by this technique can be observed

when compared with the mother plant (Bradai et al. 2019). This phenomenon is called somaclonal variation (SV) (Larkin and Scowcroft 1981). Although occasional mutations occur during the vegetative propagation *ex vitro*, those that are seen *in vitro* seem to be more frequent as consequence of the physicochemical conditions present in this environment (Yang et al. 2010).

SV may have epigenetic origin, attributed to the change on methylation of DNA pattern (Coronel et al. 2018) or genetic, where mutations, that affect since from a single base pair to complete sets of chromosomes, have structural effect on genetic material (Sarmah et al. 2017). Factors such as explant type used, plant regulators use, number and duration of subcultures and genotype can influence SV rates (Bairu et al. 2011; Sarmah et al. 2017). Although often targeted to promote large-scale multiplication of many vegetables, callus are usually associated with SV occurrence (Krishna et al. 2016).

The SV is undesirable when aiming for clonal fidelity (Krishna et al. 2016; Martínez et al. 2017), but some somaclones may have useful characteristics in various cultures (Roy and Mandal 2005; Manchanda et al. 2018). For the floristic industry, the use of somaclonal variants is even more expressive, with high chances of somaclones showing attractive features for the ornamental Market (Chen and Henny 2006; Rodrigues 2008).

Detection of SV may be archived through phenotypic analyzes (morphological, biochemical and physiological) or genotypic analyzes (cytological and molecular markers) (Bairu et al. 2011; Żabicki et al. 2019). The ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) is a dominant marker, where alleles are detected by the presence/ absence of bands, which represent amplified DNA fragments between microsatellite regions by PCR reaction (Reddy et al. 2002; Viehmannova et al. 2014). The high polymorphism detected by the marker makes it ideal for distinguish variability between individuals, even if they are closely related (Alhani and Wilkinson 1998; Reddy et al. 2002).

The goal of this study was to detect occurrence of SV, through ISSR markers, during callus formation and differentiation in *Cattleya elongata*, as well as characterize the morphogenic pathway that governs the shoots formation through them.

## Materials and methods

### *Site of execution and plant material*

The study was conducted at the Plant tissues culture laboratory (LCTV), Laboratory of genetics and plant evolution (LAGEV) and at the Plant Anatomy and Wood Identification Laboratory (LAVIM) of Biology institute at the Federal University of Bahia (UFBA). Rhizomes of *C. elongata* plants with 4-5 cm of shoots from the *in vitro* germoplasma bank of the LCTV were used as explants. These plants were germinated *in vitro* in MS (Murashige e Skoog 1962) medium culture with half of strength, 1% of myo-inositol, 1% F solution, 2% activated charcoal and 6g L<sup>-1</sup> of agar. pH was adjusted to 5,7 and the medium was autoclaved for 15 minutes at 121°C and 1,5 atm.

### *Culture medium*

The medium culture used was the Murashige and Skoog - MS (1962) with half of strength, 1% of myo-inositol, 1% F solution, 2% activated charcoal and 6g L<sup>-1</sup> of agar. pH was adjusted to 5,7 and the medium was autoclaved for 15 minutes at 121°C and 1,5 atm, without use of plant regulators. Fifteen mL of medium were distributed in 50 mL capacity tubes and closed with PVC plastic film.

### *Experimental design*

A total of 460 plants had apical meristem leafs and roots removed in laminar flow chamber and the rhizome was inoculated in fresh medium. The plants had the DNA extracted and stored and cultures were kept in grow room with 16 hours photoperiod, light intensity of 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 25  $\pm$  2°C. Another 60 plants were submitted to the same process, but had no extracted DNA, being destined to callus formation aiming anatomical analysis.

After 90 days, twenty three randomly selected callus, were used for DNA extraction and their molecular profiles were compared with their respective mother plants. Two other callus, random selected, were kept at the same culture medium for shoots differentiation. After 90 days, all shoots produced by these callus were inoculated into individual test tubes with fresh medium, where they remained for another 150 days for fresh mass accumulation. Subsequently, each shoot had its DNA extracted end stored.



### *Anatomical analysis*

The callus anatomical analysis was performed from three samples, which were blocked using synthetic histological resin (Leica® historesin). The sample were fixed in FAA (Johansen 1940) for 160 hours and dehydrated in a crescent ethyl series at 70% for 1 hour and 80%, 90%, 100% for 2 hours each. Subsequently, the material was immersed in Alcohol 100%, pure resin (1:1) for 2 hours and activated resin for 48 hours. The samples were placed in inclusion resin (activated resin + hardener) and placed on heating chamber at 50°C for polymerization.

The material was sectioned on a rotate microtome (Thermo scientific – HM 325), producing five micrometer thick section. The sections were placed on slides, stained with toluidine blue at 0.05% for 5 minutes, end fixed in Entellan®. Slides analyses were performed under an Olympus CX41 optical microscope.

### *DNA extraction and amplification*

About 1g of leafs and roots were used for DNA extraction based on hexadecyltrimethylammonium bromide 2% (CTAB) protocol by Doyle and Doyle (1987) adapted for microtubes. For callus analysis, the entire explant was used. The DNA was resuspended in 80 µL TE buffer and stored at -20°C freeze.

Amplifications were performed with 19.5 µL final volume, containing 1X reaction buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM primer, 0.2mM dNTPs, 0.75 U de Taq DNA polymerase and DNA template. Twenty ISSR primers were tested, and seven with satisfactory resolution were selected: AW3 (5'-GTG TGT GTG TGT RG-3'), CHRIS (5'-CAC ACA CAC ACA CAY G-3'), MANNY (5'-CAC CAC CAC CAC RC-3'), MAO (5'-CTC CTC CTC CTC RC-3'), UBC 844 (5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRC-3'), UBC 898 (5'-CAC ACA CAC ACA RY-3') e UBC 901 (5'-GTG TGT GTG TGT YR-3'). The amplified products were electrophoresed on 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer, stained with GelRed®, and photographed under UV light.

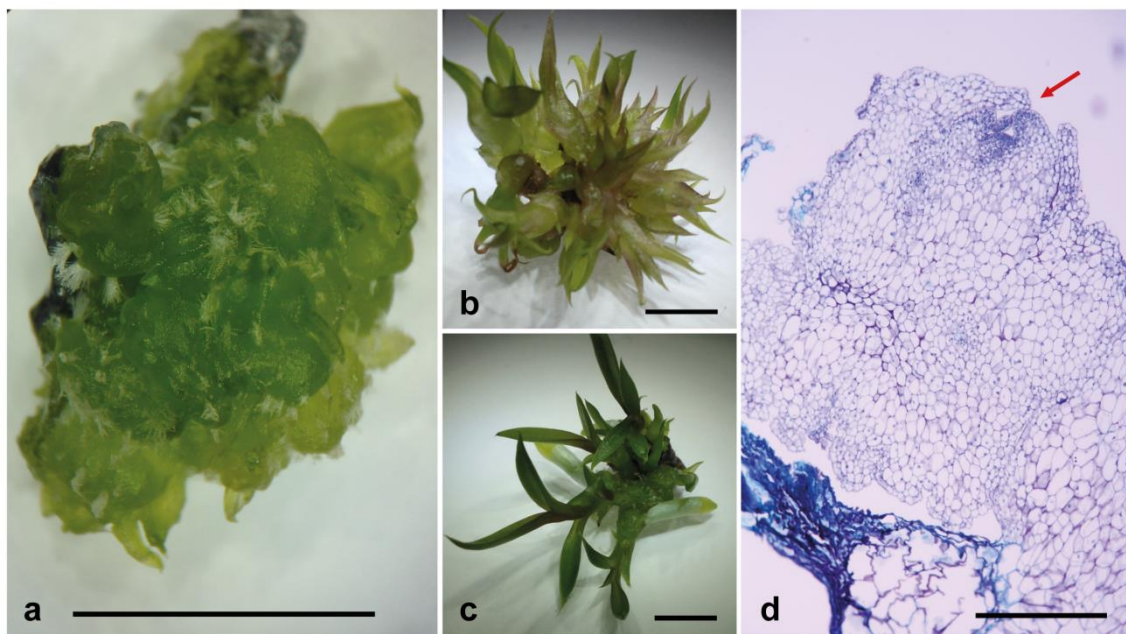
### *Molecular data analyzes*

Genetic variability between individuals was estimated from allelic frequency and percentage of polymorphic *loci* from a binary matrix of presence (1) and absence (0) of bands. Genetic similarity between same genotype individuals was estimated by Jaccard Similarity Index and the clustering was performed by UPGMA algorithm on Past software (Hammer et al. 2001).

## Results and discussion

### *Anatomical analyzes*

A callus formation rate of 5.38% was observed among the 520 tested explants. The formed callus had greenish appearance and compact texture (Figure 1a), and were able to differentiate in shoots without change of media or use of plant regulators (Figures 1b and c). The slides analyzes revealed that the callus differentiation pathway happened by the indirect organogenesis (Figure 1d).



**Figure 1** – Indirect organogenesis for *Cattleya elongata*. a – Callus (bar -1cm). b and c – Indirect morphogenesis at differences stages (bar -1cm). d- Differentiated callus shoot (arrow) (bar - 500μc).

The anatomical study showed that the superficial portions of callus gave rises to meristems able to produce shoots (Figure 1d). Regenerated shoots initially developed only the air organs (Figure 1b), with late root emission (Figure 1c). This condition, known as structural unipolarity, is typical of organogenic pathway (Roostika et al. 2016). No somatic embryogenesis was observed.

Probably, the callus emergence without the use of plant regulators observed in this study, although at low rates, can be attributed to the type of explant used. The portion corresponding at the rhizome in orchids holds the axial meristems, tissues composed of totipotent cells and therefore, more responsive to callus formation compared to those already

differentiate. (Ribeiro et al. 2015). In addition, the stress caused by explant cutting, *in vitro* conditions and especially genetic variability between explants may also have contributed for the callus formation (Ribeiro et al. 2015; Tuskan et al. 2018). The same morphogenic pathway is reported for other species of the Orchidaceae family, as *Anoectochilus elatus* Lindley. and *Vanilla planifolia* Jacks. (Mosqueda and Andreu 2015; Sherif et al. 2016).

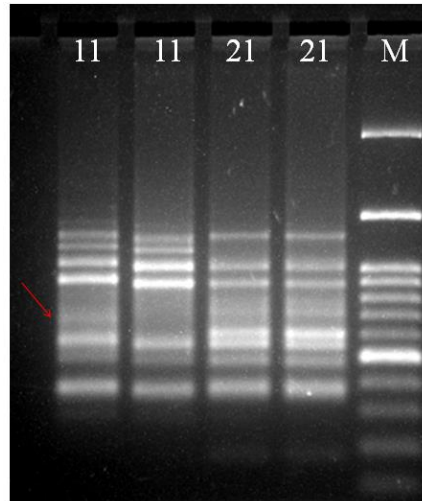
#### *Genetic stability during callogenesis*

The 23 genotypes analyzed showed 96 *loci*, ranging from 300 to 2.000 base pairs – bp. The UBC 844 and UBC 901 primers produced the largest number of analyzed bands and the largest number of polymorphic *loci* inside the genotypes (Table1). So far, no studies have been carried out to analyze genetic stability in *Cattleya* Callus.

**Table 1-** Relation of primers and number of polymorphic *loci*.

<b>Primer</b>	<b><i>Loci</i> number</b>	<b>number of polimorphic <i>loci</i></b>
AW3	13	3
CHRIS	11	0
MANNY	18	2
MAO	12	0
UBC 844	15	4
UBC 898	13	0
UBC 901	14	4
<b>Mean</b>	13,7	1,8

About 26% of analyzed genotypes presented SV at callus, as observed in genotype (Figure 2). Thus, a significant number of genotypes are affected by the VS is found for *C. elongata* during the callus phase.



**Figure 2** – Electrophoretic gel separation of PCR amplified products showing two genotypes (11 and 21) of *Cattleya elongata* amplified with MANNY primer. Samples of same number represent the haplotypes of matrix explant (left) and callus generated by the same (right). M- 100bp molecular marker. Occurrence of SV indicated by the arrow.

Callus are often targeted at tissues culture aiming the large-scale multiplication of plants, but they are usually associated with high SV rates (Krishna et al. 2016). The high SV rates observed in the study during the callus stage corroborate this idea. According Wang and Wang (2012) the majority of SV occurs in the callus phase, which causes these, together with the plants derived from, to be associate with genetic instability (Cao et al. 2016).

The high rates of SV presents in callus are associated at cellular dynamics at this tissue type (Skirvin et al. 1994; Bairu et al. 2006), which is often composed by cells with elevated division rates (Figure 1d). Assuming that DNA duplication and segregation are process than provide favorable scenarios for mutation occurrence (Hao and Deng 2002), it is assumed that the higher the material multiplication rate, the greater the chances of SV emergency and accumulation (Skirvin et al. 1994), as related by Guranna et al. (2017) for *Punica granatum* L.

Often, for desirable metabolic responses to be achieved *in vitro*, the use of plants regulators is required (Mosqueda and Andreu 2015; Anandan et al. 2018; Żabicki et al. 2019) however, this substances tend to increase the chances of genetic variations (Mosqueda and Andreu 2015; Peng et al. 2015; Halim et al. 2018).

This loss of genetic fidelity is associated with two possible effects of plant regulators. The first occurs when the regulator itself functions as a mutagen and the second, when these agents increase the cell division rates to the point that mitosis occurs even before the total duplication of genetic material (Krishna et al. 2016). The choice not to use plant regulators in

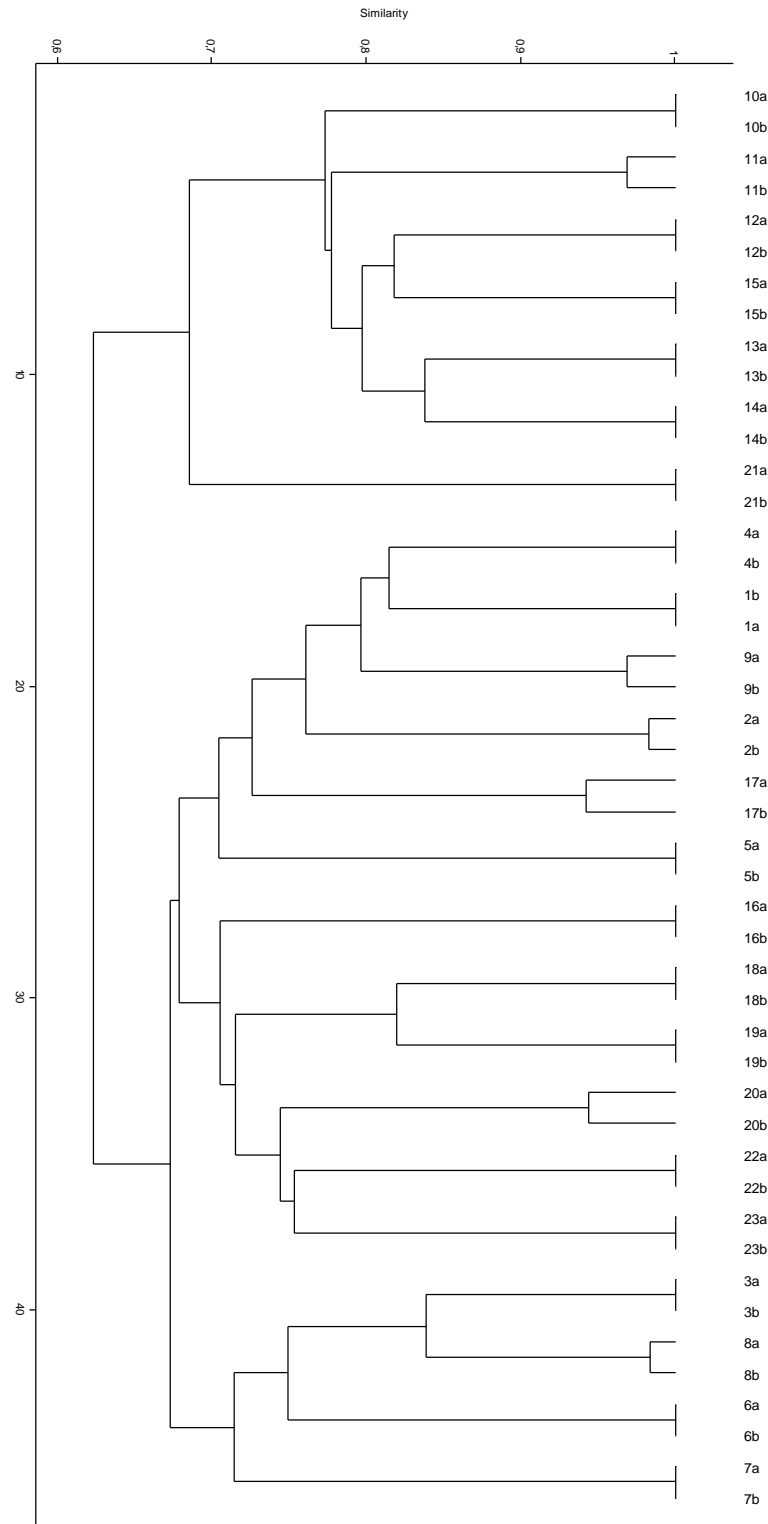
this study aimed to remove this possible confounding variable, so we know that the observed result is not associated with the use of plant regulators, which could possibly increase the VS rates.

Another relevant aspect of study is the susceptibility of specific *C. elongata* genotypes to SV events. Three mutations were detected in genotypes 11, 17 e 20 (Table 2). Such data reveal high SV frequency for specific genotypes, as seen for olive genotypes by Bradai et al. (2019).

**Table 2** – Relation of affected genotype by SV, primers and polymorphic *loci* number for the same.

<b>Affected genotype</b>	<b>Primer</b>	<b>Polymorphic <i>loci</i> number</b>
2	AW3	1
17	AW3	1
20	AW3	1
11	MANNY	1
20	MANNY	1
9	UBC 844	2
17	UBC844	1
20	UBC844	1
8	UBC 901	1
11	UBC 901	2
17	UBC 901	1

Despite the SV occurrence, the same genotype individuals were more similar to each other than to the other ones (Figure 3).



**Figure 3:** Dendrogram showing the genetic similarity between callus of *C. elongata* and their respective mother plants (represented by the same numbers, added by the letters a and b), calculated from the ISSR markers matrix, based on Jaccard similarity index and UPGMA algorithm.

If the objective of *in vitro* multiplication is obtain exclusively clones from mother plant, the SV represents a problem. It can generate undesirable characteristics in regenerated plants and consequently significant damage (Krishna et al. 2016; Martínez et al. 2017) however, when Larkin and Scowcroft coined the term somaclonal variation (1981), they already predicted this source of variation could be useful for plant breeding. Nowadays, this prediction comes true with the occasional emergence of somaclones with desirable characteristics in the most vary cultures such as sugar cane, tomato and rice (Barden et al. 1986; Roy and Mandal 2005; Manchanda et al. 2018)

For the floristic industry the use of variants arising from somaclonal variants is even more significant, with significant chances of these cultivars presenting attractive characteristics to the floristic market, as reported for heliconia, chrysanthemum, azalea and some orchids (Schepper et al. 2003; Hsu et al. 2008; Rodrigues 2008; Miler and Zalewska 2014; Dehgahi and Joniyas 2017). This scenario makes possible the use of somaclones obtained by indirect organogenesis to *C. elongata*.

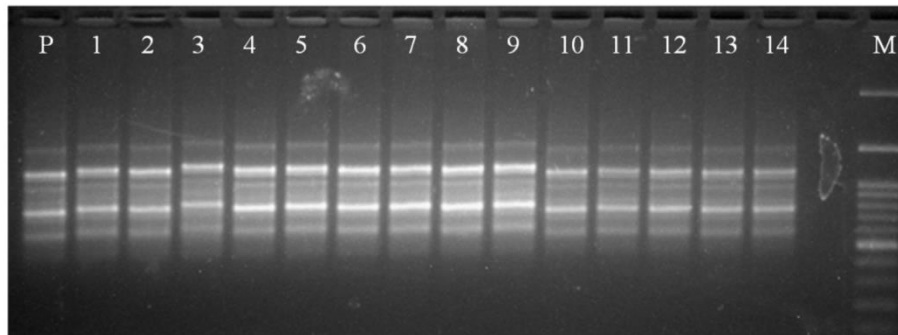
Another extremely important application of somaclones may be the restoration or increase of genetic diversity of threatened species (Żabicki1 et al. 2019), or with economic importance (Karim et al. 2015; Mosqueda and Andreu 2015). This application is even more important for plants with long juvenile stage or traditionally vegetatively propagated (Krishna et al. 2016), such as *C. elongata*.

#### *Callus regenerated plants*

Both genotypes worked (genotypes A and B) presented large number of regenerated shoots, generating 52 and 51 shoots respectively. Genotype A plants showed 61 *loci*, while B plants, 66. There was no detection of polymorphism for any of 103 tested plants.

This large number of shoots is similar to that found by Sherif et al. (2016) for *Anoectochilus elatus* Lindley., who verified an average of 41.8 shoots per explant. For *Vanilla planifolia* Jacks., Mosqueda and Andreu (2015) found an average 6.8 shoots per explant, showing that some species of orchids are more responsible to the indirect organogenesis than others. Despite the variation of amount of plants produced, the use of plants regulators occurred for both *A. elatus* and *V. planifolia* (Mosqueda and Andreu 2015; Sherif et al. 2016). The largest number of shoots generated by *C. elongata* without the use of plant regulators seems to show that the species responds well to the indirect organogenesis pathway.

The absence of polymorphic *loci* among the regenerated callus shoots when compared to the mother plants (Figure 4), characterizes them as clones. This result differs from what is often seen for callus regenerated plants, which tend to have higher rates of SV than plants generated directly from tissues (Bhatia et al. 2009; Goyal et al. 2015; Cao et al. 2016). In addition, the high SV rates found in callus obtained in the previous experiment did not occur among the 103 analyzed shoots in this experiment.



**Figure 4** – Electrophoretic gel separation of PCR amplified products showing the haplotypes of B genotype of *Cattleya elongata* generated shoots when amplified by UBC 898 primer. P- Mother plant haplotype. 1 – 14: Haplotypes of different clones regenerated by indirect organogenesis, M- 100bp molecular marker.

Although it is assumed that calogenic tissue is prone to SV events (Wang and Wang 2012), a much more complex scenario should be considered. The callus may present concomitantly both true types cells (identical to the mother cell), and VS affected, whether epigenetic (Krizova et al. 2009) or genetic (Hao and Deng 2002).

A remarkable theory proposed by Wang and Wang (2012) can provide an explanation for this apparently contradictory data. According to these authors, an event analogous to natural selection can be observed at cellular level on *in vitro* tissues, given the similarities between populations of a species and cell lines or even plant tissues.

Both neutral and select theory of molecular evolution say that a mutation is much more likely to be neutral or deleterious, and the likelihood of advantageous or adaptive mutations occurring is very small (Ohta 1992; Hahn 2008). Even if a mutation is considerably beneficial, many cells generations would be required for them to become majority on tissue (Wang and Wang 2012). Thus, SV-bearing cells usually have reduced *fitness*, which makes them not prevalent in calogenic tissues (Wang and Wang 2012).

According the same authors (Wang and Wang 2012), although there is a VS accumulation in callus, a bottleneck effect can exist, acting as an evolutionary filter and



promoting reduction in SV rates. In this scenario, only cells that have not mutated in the set of genes responsible for tissue differentiation would be able to promote shoots formation.

It is important to say that just when the SV has an effect on the cell/tissue phenotype, such as fitness reduction and/or inability to promote tissues differentiation, these can be selected. It explains why plants can present genetic alterations during the callus phase that are not necessarily reflected in plants regenerated from them, as seen by Hao and Deng (2002) for *Citrus*. This phenomenon may also explain, at least in part, the absence of polymorphic *loci* in shoots obtained through indirect organogenesis for *C. elongata*. Despite the possible reduction of SV caused by bottleneck effect, it seems unlikely that it will completely eliminate the SV (Wang and Wang 2012), making possible the production of somaclones that have desirable characteristics.

Clones generated by the same pathway are also described for *Sesamum indicum* L., *Helicteres isora* L. and *Jatropha curcas* L. (Muthukumar et al. 2016; Nasir et al. 2017; Anandan et al. 2018). Genetically stable plants were also obtained from callus for the orchid *Habenaria edgeworthii* (Giri et al. 2012). However, a different result was found by Mosqueda and Andreu (2015) when analyzed plants of *Vanilla planifolia* Jacks., regenerated by the same route. These authors found 71.66% of polymorphic *loci* among mother plants and regenerated shoots, using six ISSR primers, which indicates higher SV susceptibility of certain orchid species.

Currently, ISSR markers are often used for SV detection in wide range crops, including yacon, pistachio and pineapple (Viehmannova et al. 2014; Peng et al. 2015; Akdemir et al. 2016; Iannicelli et al. 2016; Kohpail et al. 2017; Żabicki et al. 2019) and also for orchids such as *Phalaenopsis gigantea* J. J. Sm., *Vanilla planifolia* Jacks. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Samarfard et al. 2014; Mosqueda and Andreu 2015; Tikendra et al. 2019). Although these markers are used to amplify mainly non-coding regions of genome, they can amplify regions containing expressed sequences (Reddy and Siddiq 2002; Mishra et al. 2019). Thus, this type of marker, although often associated with non-coding regions, may provide insights about the bottleneck effect proposed by Wang and Wang (2002).

Contrary to popular belief, some phenomena that guide the biological evolution, such as mutation and bottleneck effect, seem to occur even *in vitro*, and *C. elongata* was an ideal subject of study for such scenario. However, further research should be conducted with a greater number of callus for the effective confirmation of the phenomenon.

## Final Considerations

The callus formation rate in *C. elongata* without the use of plant regulators is low, and the differentiation of the shoots was due by indirect organogenesis. There is a great accumulation of SV for species in callus phase, but the shoots generated from them do not seem to be affected by SV. The explanation for this phenomenon is based on the possible reduction of the morphogenetic capacity in the tissues affected by SV, that might not be able to regenerate shoots.

## Author contribution statement

GSN, MCB, KRBL and ASS defined the experimental design and wrote the manuscript. GSN, ILR, MNGM performed the experiments.

## References

- Alhani MC, Wilkinson MJ (1998) Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding* 117:573-575.
- Akdemir H, Suzerer V, Tilkat E et al (2016) Detection of variation in long-term micropropagated mature pistachio via DNA-based molecular markers. *Applied biochemistry and biotechnology* 180:1301-1312.
- Anandan R, Prakash M, Deenadhayalan T et al (2018) Efficient *in vitro* plant regeneration from cotyledon-derived callus cultures of sesame (*Sesamum indicum* L.) and genetic analysis of True-to-Type regenerants using RAPD and SSR markers. *South African Journal of Botany* 119:244-251.
- Bairu MW, Fennell CW, Van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae* 108:347-351.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63:147-173.
- Barden KA, Smith SS, Murakishi HH (1986) Regeneration and screening of tomato somaclones for resistance to tobacco mosaic virus. *Plant science* 45:209-213.
- Bhatia R, Singh KP, Jhang T et al (2009) Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 119:208-211.

Bradaï F, Sánchez-Romero C, Martín C (2019) Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. *Scientia Horticulturae* 251:260-266.

Cao Z, Sui S, Cai X et al (2016) Somaclonal variation in 'Red Flash' caladium: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126: 269-279.

Chen J, Henny RJ (2006) Somaclonal variation: an important source for cultivar development of floriculture crops. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology* 2:244-253.

CITES (2017) Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices II. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>. Accessed in 15 June 2019.

Coronel CJ, González AI, Ruiz M L et al (2018) Analysis of somaclonal variation in transgenic and regenerated plants of *Arabidopsis thaliana* using methylation related metAFLP and TMD markers. *Plant cell reports* 37:137-152.

Cruz DD, Borba EL, van den Berg C. (2003) O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no estado da Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 3:26-34.

Dehgahi R, Joniyas A (2017) Review of research on *Dendrobium sonia*-28, Orchidacea family and mutation as somaclonal variation. *International Journal of Biosciences* 10: 29-47.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

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 (Orgs.) *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal, p. 67-68.

Giri L, Jugran A, Rawat S et al (2012) *In vitro* propagation, genetic and phytochemical assessment of *Habenaria edgeworthii*: an important Astavarga plant. *Acta physiologiae plantarum* 34:869-875.

Giulietti AM, Queiroz LD, Harley RM (1996) Vegetação e flora da Chapada Diamantina, Bahia. *Anais da 4ª Reunião Especial da SBPC*, Feira de Santana: 144-156.

Givnish TJ, Spalink D, Ames M et al (2016) Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography* 43:1905-1916.

Goyal AK, Pradhan S, Basistha BC et al (2015) Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech* 5:473-482.

Guranna P, Hosamani I, Sathyanarayana R. et al (2017) Micropropagation in Pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. 'Bhagwa' through Indirect Organogenesis and Assessment of Genetic Fidelity by RAPD Marker. *Biotechnology Journal International* 20:1-8.

Hahn M W (2008) Toward a selection theory of molecular evolution. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 62:255-265.

Halim NAA, Tan BC, Midin MR et al (2018) Abscisic acid and salinity stress induced somaclonal variation and increased histone deacetylase (HDAC) activity in *Ananas comosus* var. MD2. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133:123-135.

Hao YJ, Deng XX (2002) Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38:472-476.

Hsu TW, Tsai WC, Wang DP et al (2008). Differential gene expression analysis by cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis* Hsiang Fei cv. HF and its somaclonal variant. *Plant Science* 175(3): 415-422.

Iannicelli J, Pérez de la Torre MC, Coviella MA et al (2016) *In vitro* propagation of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers of *in vitro*-cultured plants. *Revista de la Facultad de Agronomía* 115:67-76.

Karim R, Ahmed F, Roy UK et al (2015) Varietal improvement of strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) through somaclonal variation using *in vitro* techniques. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17: 977-986.

Kohpaii FN, Farahani F, Noormohammadi Z (2017). Somaclonal variation in the *in vitro* regenerated pineapple (*Ananas comosus*): investigation of the cellular characteristics, biochemical specificities and ISSR markers. *Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation* 23(1):73-83.

Krishna H, Alizadeh M, Singh D et al (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6:54.

Krizova K, Fojtova M, Depicker A et al (2009) Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles. *Plant Physiology* 149:1493-1504.

Larkin PJ (1998) Introduction. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (Eds) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 3–13.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics* 60:197-214.

Manchanda P, Kaur A, Gosal SS (2018) Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. *Biotechnologies of Crop Improvement* 1:299-326.

Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Salinas-Ruíz J et al (2017) Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 53:553-560.

Miler N, Zalewska M (2014) Somaclonal variation of chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 13:69-82.

Mishra R, Rout E, Mohanty JN et al (2019) Sequence-tagged site-based diagnostic markers linked to a novel anthracnose resistance gene RCt1 in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *3 Biotech* 9:9.

Mosqueda MAR, Andreu LGI (2015) Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123:657-664.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.

Muthukumar M, Kumar TS, Rao MV (2016) Organogenesis and evaluation of genetic homogeneity through SCoT and ISSR markers in *Helicteres isora* L., a medicinally important tree. *South African journal of botany*, 106:204-210.

Nasir NANM, Anuar N, Zainuddin Z et al (2017) Evaluation of genetic homogeneity of *Jatropha curcas* L. hybrid at an early stage of shoot bud formation from petioles using ISSR marker. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31:45-50.

Ohta T (1992) The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:263-286.

Peng X, Zhang TT, Zhang J (2015) Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122:67-77.

Phillips GC (2004). *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40(4):342-345.

Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S et al (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:16-24.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.

Ribeiro LM, Peixoto JR, de Andrade SRM et al (2015) Organogênese *In Vitro* em acessos de Maracujazeiro Amarelo infectados pelo vírus CABMV. *Unimontes Científica* 8:87-98.

Rodrigues PHV (2008) Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae). *Scientia Agricola* 65:681-684.

Roostika I, Mariska I, Khumaida N et al (2016) Indirect organogenesis and somatic embryogenesis of pineapple induced by dichlorophenoxy acetic acid. *Journal AgroBiogen* 8:8-18.

Roy B, Mandal AB (2005) Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation. *Euphytica* 145:221-227.

Samarfard S, Kadir MA, Kadzimin SB et al (2014) *In vitro* propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thidiazuron combinations. *HortScience*, 49(1):82-88.

Sarmah D, Sutradhar M, Singh BK (2017) Somaclonal variation and its application in ornamentals plants. *Int. J. Pure App. Biosci* 5:396-406.

Schepper S, Debergh P, Van Bockstaele E et al (2003) Genetic and epigenetic aspects of somaclonal variation: flower colour bud sports in azalea, a case study. *South African journal of botany* 69:117-128.

Shahzad A, Parveen S, Sharma S, Shaheen A, Saeed T, Yadav V, Akhtar R, Ahmad Z, Upadhyay A (2017) Plant tissue culture: Applications in plant improvement and conservation. In: Abdin MZ, Khantwal U, Kamaluddin M, Ali A (Eds.) *Plant Biotechnology: Principles and applications*. Springer Singapore: Springer, pp. 37-72.

Sherif NA, Kumar TS, Rao MV (2016) *In vitro* regeneration by callus culture of *Anoectochilus elatus* Lindley, an endangered terrestrial jewel orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52:72-80.

Suzuki RM, Ferreira WM. (2007) Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: L.M. Barbosa & N.A. Santos Jr. (Orgs.). *A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. Imprensa Oficial, São Paulo, pp. 655-659.

Skirvin RM, McPheeters KD, Norton M (1994) Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience* 29:1232-1237.

Tikendra L, Amom T, Nongdam P (2019) Molecular genetic homogeneity assessment of micropropagated *Dendrobium moschatum* Sw. - A rare medicinal orchid, using RAPD and ISSR markers. *Plant Gene*, 19: 100196. 10.1016/j.plgene.2019.100196.

Tuskan GA, Mewalal R, Gunter LE et al (2018) Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach. *PloS one* 13(8): e0202519.

van den Berg, C (2014) Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). *Phytotaxa* 186:75-86.

Viehmanna I, Bortlova Z, Vitamvas, J et al (2014). Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology* 17:102-106.

Wang QM, Wang L (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant cell reports* 31:1535-1547.

Yang WR, Zhang QX, Pan HT et al (2010) *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. *Propag Ornament Plants* 10:59-66.

Żabicki P, Sliwinska E, Mitka J et al (2019) Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic studies of *in vitro* propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit.(Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136:339-352.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatou-se a ocorrência de variação somaclonal (VS) em ambas as rotas morfogênicas estudadas para *C. elongata*, no entanto, a dinâmica deste fenômeno variou de acordo com a via de diferenciação.

Para plantas obtidas através de organogênese direta durante sete gerações micropropagadas verificou-se que, apesar da redução na velocidade de crescimento dos brotos a cada três ciclos de multiplicação, não foi constatada variação no número de brotos gerados por explante ao longo do experimento. VS foi detectada em 36,8% dos genótipos estudados, no entanto, as plantas portadoras de *loci* polimórficos ainda se mantiveram altamente similares geneticamente às respectivas plantas mãe.

Ficou claro que o genótipo e o número de subculturas tem influência sobre as taxas de VS nos brotos regenerantes. A possibilidade de ocorrência de quimeras *in vitro* pode justificar parte da variação dos haplótipos ao longo das subculturas, fazendo com que estes variem durante a micropropagação. Polimorfismo foi detectado para plantas oriundas da organogênese direta a partir da segunda geração de subcultivo, apontando a suscetibilidade da espécie à VS. O maior empecilho durante a micropropagação da espécie foi a susceptibilidade dos explantes à oxidação fenólica durante o estabelecimento inicial das subculturas.

Análises anatômicas comprovaram a origem através de organogênese dos brotos advindos de calos para a espécie. Embora polimorfismo tenha sido detectado em 26% dos calos analisados, a VS não foi detectada em nenhum dos 103 brotos oriundos de organogênese indireta. A explicação proposta para esse fenômeno baseia-se na possível redução da capacidade morfogênética nos tecidos afetados pela VS, que passariam a não gerar brotos.

Desta forma, tentou-se esclarecer a dinâmica da VS durante o cultivo *in vitro* de *C. elongata*, o que pode fornecer base não somente para o manejo *in vitro* da espécie, mas a tornar um objeto modelo no entendimento de fenômenos como mutação e efeito gargalo *in vitro*.