



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Mariana Oliveira Medeiros

**MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE  
BAUNILHA (*Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *V. planifolia* Jack ex. Andrews)**

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília, 2023

Mariana Oliveira Medeiros

**MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE  
BAUNILHA (*Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *V. planifolia* Jack ex. Andrews)**

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, com pesquisa desenvolvida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para obtenção do título de Mestra em Botânica.

Brasília, 2023

## Folha de Aprovação

Dissertação apresentada por Mariana Oliveira Medeiros, com o título: MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE BAUNILHA (*Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews) ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB como requisito à obtenção do título de Mestra.

A Dissertação foi aprovada em sua forma final pela comissão julgadora instituída pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

---

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira  
Departamento de Botânica, IB/UnB  
(Presidente)

---

Dr. Roberto Fontes Vieira  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
(Membro externo)

---

Dra. Rosete Pescador  
Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC  
(Membro externo)

---

Dra. Sueli Maria Gomes  
Departamento de Botânica, IB/UnB  
(Membro interno, Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida, pelas oportunidades e pessoas incríveis que coloca em meu caminho.

Aos meus pais, André e Sandra, que nunca mediram esforços para que eu seguisse os meus sonhos, apoiando e incentivando nos momentos de vitórias e conquistas, mas também, aconselhando nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus avós, Maria da Conceição, pela compreensão e apoio, mesmo preferindo que eu ficasse em casa cuidando dela, José Henrique (*in memoriam*) e Maria Abadia, que mesmo longe estavam sempre rezando e na torcida por mim.

Aos meus irmãos, Pedro Henrique e João Paulo, cunhada, Daniella, e tios, Adriana Apio, Adriana Oliveira, Siloé, Ildomar e Lucília, pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos de falta de paciência.

Ao Prof. Dr. Jonny pela paciência e dedicação na orientação de cada passo que dei durante esse período.

Aos colegas de trabalho pelo incentivo e ajuda, sempre dispostos e compreensivos.

A Dra. Bárbara e ao Dr. Paulo, pela disponibilidade, ensinamentos cedidos e ajuda com a microbiologia vegetal. A Dra. Ana, pela ajuda com a microscopia eletrônica de varredura.

Meus sinceros agradecimentos a todos.

## RESUMO

O estudo foi realizado com o objetivo de introduzir técnicas inovadoras para propagação *in vitro* e conservação de crescimento lento de espécies de baunilha (*Vanilla planifolia* e *V. phaeantha*). O foco primário desta pesquisa foi avaliar a eficácia da técnica de dupla fase e a utilização de sistemas de biorreatores de imersão temporária na multiplicação clonal. Adicionalmente, o trabalho teve como objetivo identificar condições ótimas para a aclimatização das plântulas. Além disso, devido à forte contaminação bacteriana observada no início do estabelecimento *in vitro*, o estudo incluiu o isolamento, identificação e controle dessas bactérias ocorrentes na cultura. Para conservação *in vitro*, testou-se o tipo de carboidrato (sacarose e sorbitol) em diferentes concentrações (0; 43,8; 87,6 mM) e combinação no meio MS, juntamente com três temperaturas (10, 20 e 25°C). A fase inicial envolveu os acessos de estabelecimento *in vitro*. Para tratar a contaminação endofítica, os explantes foram submetidos a um processo de descontaminação pela adição de Ampicilina Sódica ao meio de cultura em concentrações variáveis (0, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>) para até cinco subcultivos. As bactérias presentes na cultura durante a fase de estabelecimento foram isoladas e identificadas utilizando a sequência 16S rRNA. O estudo também avaliou a influência de diferentes consistências de meios de cultura (líquido, dupla-fase e semissólido) e o uso de três modelos de biorreatores de imersão temporária (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>) na multiplicação. As plântulas resultantes foram aclimatizadas em mistura de substrato comercial e fibra de coco com composição variável e mantidas em câmara de crescimento antes de serem transferidas para casa de vegetação. Verificou-se que o uso de Ampicilina Sódica levou a uma redução significativa da contaminação bacteriana em cinco subculturas. O sequenciamento utilizando o gene 16S rRNA possibilitou a identificação de bactérias contaminantes, incluindo espécies dos gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Hesbaspirillum* e *Methylobacterium*. Na avaliação da consistência do meio, o método de dupla fase emergiu como a alternativa superior para a multiplicação das espécies, produzindo maior número de brotações por explante (7,0±0,4) em relação ao meio semissólido (5,3±0,3). Entre os modelos de biorreator de imersão temporária, o RALM<sup>®</sup> superou a RITA<sup>®</sup> e a BIT<sup>®</sup> em termos de número de brotos formados por explante (8,2±0,3; 4,9±0,2 e 1,2±0,1, respectivamente). A utilização de substratos compostos por substrato comercial e fibra de coco, em qualquer combinação testada, mostrou-se eficaz, garantindo 100% de sobrevivência das plântulas de baunilha em casa de vegetação. A adição de 43,8 mM de sacarose e 43,8 mM de sorbitol ao meio de cultura, a 20°C, mostrou-se adequada para a conservação *in vitro* de espécies de baunilha, sem comprometer a capacidade fotossintética da parte aérea.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, meio líquido, contaminação endofítica, micropropagação em larga escala, conservação *in vitro*

## ABSTRACT

The study was carried out with the aim of introducing innovative techniques for in vitro propagation and slow-growth conservation of vanilla species (*Vanilla planifolia* and *V. phaeantha*). The primary focus of this research was to evaluate the effectiveness of the double-phase technique and the utilization of temporary immersion bioreactor systems on clonal multiplication. Additionally, the study aimed to identify optimal conditions for plantlets acclimatization. Moreover, due to the strong bacterial contamination observed at the beginning of the in vitro establishment, the study included the isolation, identification, and control of these bacteria occurring in the culture. For in vitro conservation, the type of carbohydrate (sucrose and sorbitol) at different concentrations (0; 43.8; 87.6 mM) and combination in the MS medium, along with three temperatures (10, 20 e 25°C), were tested. The initial phase involved the in vitro establishment accessions. To address endophytic contamination, the explants underwent a decontamination process by adding Sodium Ampicillin to the culture medium at varying concentrations (0, 250, and 500 mg L<sup>-1</sup>) for up to five subcultures. The bacteria present in the culture during the establishment phase were isolated and identified using the 16S rRNA sequence. The study also assessing the influence of different consistencies of culture media (liquid, double-phase, and semisolid), and the use of three temporary immersion bioreactor models (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup>, and BIT<sup>®</sup>) on multiplication. The resulting plantlets underwent acclimatization in a mixture of commercial substrate and coconut fiber with varying composition and were kept in a growth chamber before being transferred to a greenhouse. It was verified that the use of Sodium Ampicillin led to a significant reduction in bacterial contamination over five subcultures. Sequencing using the 16S rRNA gene enabled the identification of contaminant bacteria, including species of the genera *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Hesbaspirillum*, and *Methylobacterium*. When evaluating the medium's consistency, the double-phase method emerged as the superior alternative for species multiplication, yielding a greater number of shoots per explant (7.0±0.4) compared to the semisolid medium (5.3±0.3). Among the temporary immersion bioreactor models, RALM<sup>®</sup> outperformed RITA<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> in terms of the number of shoots formed per explant (8.2±0.3; 4.9±0.2, and 1.2±0.1, respectively). The use of substrates composed of commercial substrate and coconut fiber, in any combination tested, proved to be effective, ensuring 100% survival of vanilla plantlets in greenhouse. The addition of 43.8 mM of sucrose and 43.8 mM of sorbitol to the culture medium, at 20°C, was found to be suitable for the in vitro conservation of vanilla species, without compromising photosynthetic capacity of the shoots.

**Keywords:** Orchidaceae, liquid medium, endophytic contamination, large-scale micropropagation, in vitro conservation.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Diagrama esquemático de uma flor de orquídea. Anther: antera. Column: coluna. Inner tepal: pétala interna. Lip: labelo. Outer tepal: sépala externa. Ovary: ovário. Pollinia: polínia. Stigma: estigma. Fonte: Aceto e Gaudio (2011).....24
- Figura 2.** Distribuição geográfica de espécies do gênero *Vanilla*. Fonte: Gantait e Kundu (2017).....25
- Figura 3.** *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. A – Estrutura vegetativa (caule e folhas). B – Estrutura reprodutiva (flor). C – Fruto. Fonte: inaturalist.org (A – Lee-Roy Estrale; B – Ariel Salinas Seq.; C – Kinardo Flores Castro).....26
- Figura 4.** *Vanilla phaeantha* Rchb. f. A – Estrutura reprodutiva (flor). B – Estrutura vegetativa (caule e folhas). C – Fruto. Fonte: acervo pessoal (A – Mariana Oliveira Medeiros; B e C – Márcia José Ribeiro).....27

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Contaminação durante o estabelecimento *in vitro* de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.). A – Contaminação bacteriana em diferentes estágios. B – Contaminação bacteriana. C – Contaminação bacteriana e fúngica. Estrela: contaminação por fungo. Ponto: contaminação por bactéria. Escala: A – 2,5 cm. B e C – 1 cm.....61
- Figura 2.** Aspecto dos cultivos no sexto subcultivo do processo de limpeza de bactérias endofíticas, do acesso DBS647 de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., com Ampicilina Sódica. A – Ágar Nutriente sem contaminação bacteriana para quatro amostras. B – Ágar Nutriente apresentando contaminação bacteriana em duas amostras de quatro. C – Amostras de brotos jovens, cultivados meio básico sem antibiótico, desprovidos de contaminação bacteriana. Escala: A, B e C – 1 cm.....66

**Figura 3.** Aspecto dos cultivos no sexto subcultivo do processo de limpeza de bactérias endofíticas, do acesso LBB de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., com Ampicilina Sódica. A e B – Ágar Nutriente sem contaminação bacteriana para oito amostras. C – Amostras de brotos jovens, cultivados em meio básico sem antibiótico, desprovidos de contaminação bacteriana. Escala: A, B e C – 1 cm.....67

**Figura 4.** Cortes transversais do caule de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. cultivada *in vitro* com bactérias endofíticas intracelulares e epifíticas visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A. Parte externa do caule com bactérias com diferentes formatos (algumas destacadas em cores diferentes). B. Parte externa do caule com bactérias. C. Secção caulinar com bactérias endofíticas intracelulares. D. Secção caulinar com menor densidade bacteriana. Escalas: A, B, D: 20 µM, C: 10 µM, B': 2,5 µM. Magnificações: A, B, D: 1000 x, B': 5000 x, C: 2000 x.....68

**Figura 5.** Taxa de multiplicação clonal acumulada de acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647, durante o período de limpeza bacteriana. Partindo de 3 microestacas foi alcançando 274 brotações para o acesso LBB, e partindo-se de 4 microestacas foi alcançando 202 brotações para o acesso DBS647.....71

**Figura 6.** Bactérias endofíticas isoladas e purificadas, em meio de KH, com 72 horas de crescimento à 28±2°C, do cultivo *in vitro* de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., durante a fase de estabelecimento. A e A' – B3. B e B' – B4. C e C' – B5. D e D' – B9. E e E' – B15. F e F' – B16. Escalas: A, B, C, D, E e F – 1 cm. A' e B' – 1 mm. C', D', E' e F' – 0,5 mm.....73

**Figura 7.** Relações evolutivas entre os possíveis gêneros de bactérias endofíticas oriundas de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., na fase de estabelecimento *in vitro*, identificadas a partir do *primer* 16S rRNA.....75

**Figura 8.** Efeito de diferentes consistências do meio de cultura (semissólido, dupla-fase e líquido) sobre o desenvolvimento e multiplicação de brotações de duas espécies de baunilhas - *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews, após 90 dias de cultivo. A – Repetição, contendo um frasco com meio semissólido, um frasco com meio dupla-fase, um frasco com meio líquido, e cinco explantes por frasco. B – Tratamentos com *Vanilla planifolia*. C – Tratamentos com *Vanilla phaeantha*. Escala: A, B e C – 1,5 cm.....77



- Figura 9.** Alongamento de brotos de duas espécies de baunilhas - *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews, oriundos do experimento em meio com diferentes consistências (semissólido, dupla-fase e líquido), após 60 dias de cultivo. A – Tratamentos com *Vanilla planifolia*. B – Tratamentos com *Vanilla phaeantha*. Escala: A e B – 2,5 cm.....79
- Figura 10.** Influência de diferentes modelos de recipientes de vidro na multiplicação *in vitro* de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), após 90 dias de cultivo. A – Dia 1 do cultivo. B –Dia 90 do cultivo. Escala: A e B – 2,5 cm.....80
- Figura 11.** Modelos de biorreatores, com sistema de imersão temporária, utilizados. A - RITA<sup>®</sup>. B - BIT<sup>®</sup>. C - RALM<sup>®</sup>. Escalas: A – 2 cm, B e C – 3 cm.....82
- Figura 12.** Cultivo de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.) em biorreator de imersão temporária. Escala: 4cm.....82
- Figura 13.** Avaliação da multiplicação clonal de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), com auxílio do biorreator de sistema de imersão temporária do modelo RALM<sup>®</sup>. Escala: 1 cm.....83
- Figura 14.** Alongamento de brotos de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), multiplicados por 90 dias em diferentes modelos de biorreator de imersão temporária. A – Modelo RITA<sup>®</sup>. B – Modelo RALM<sup>®</sup>. C – Sistema tradicional (meio semissólido). Escala: 2 cm.....84
- Figura 15.** Avaliação do enraizamento e aclimatização, em diferentes substratos combinados em variadas proporções, de mudas de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.). A – Substrato comercial e fibra de coco, e suas combinações. B – Mudas oriundas do cultivo *in vitro*. C – Mudas plantadas e mantidas em BOD. D – Mudas aclimatizadas com 30 dias. E e F – Mudas aclimatizadas com 90 dias, mantidas em casa de vegetação. Escala: B – 2 cm.....86

## CAPÍTULO II

- Figura 1.** Aspecto dos explantes de baunilha no primeiro dia de conservação *in vitro* sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose e/ou sorbitol. Escala: 2,5 cm.....102
- Figura 2.** Aspecto de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. *in vitro* após 12 meses de cultivo sob influência de diferentes temperaturas e carboidratos. A – Temperatura de 20°C. B – Temperatura de 25°C. Escala: A e B – 2,5 cm.....109

**Figura 3.** Aspecto de brotações de *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews *in vitro* após 12 meses de cultivo sob influência de diferentes temperaturas e carboidratos. A – Temperatura de 20°C. B – Temperatura de 25°C. Escala: A e B – 2,5 cm.....109

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Percentual de contaminação fúngica e bacteriana durante o estabelecimento <i>in vitro</i> dos acessos LBB e DBS647 de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f.....	62
<b>Tabela 2.</b> Percentual de contaminação fúngica e bacteriana via teste de fitotoxicidade de explantes de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. com Ampicilina Sódica.....	62
<b>Tabela 3.</b> Percentual de desenvolvimento de explantes de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. submetidos ao teste de fitotoxicidade com Ampicilina sódica.....	63
<b>Tabela 4.</b> Percentual de contaminação bacteriana (visual e em Ágar Nutriente) em acessos de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. – LBB e DBS647, em cinco subcultivos com 500 mg L <sup>-1</sup> de Ampicilina Sódica adicionado ao meio de cultura.....	65
<b>Tabela 5.</b> Média da altura de brotações dos acessos de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. – LBB e DBS647, durante cinco subcultivos <i>in vitro</i> .....	70
<b>Tabela 6.</b> Taxa de multiplicação clonal média de acessos de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. – LBB e DBS647, durante o período de limpeza bacteriana e após cinco subcultivos.....	71
<b>Tabela 7.</b> Dados obtidos a partir do sequenciamento, com auxílio do primer 16S rRNA, de amostras de DNA bacteriano isolado de bactérias endofíticas oriundas de brotações de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f., na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> .....	75
<b>Tabela 8.</b> Média do número de brotos por explante, de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks ex. Andrews e <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f, cultivados em meio líquido, dupla-fase e semissólido, após 90 dias de cultivo.....	78
<b>Tabela 9.</b> Média da altura e enraizamento de brotos de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks ex. Andrews e <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f., na fase de alongamento, oriundos dos cultivos em meio dupla-fase e semissólido, após 60 dias de cultivo.....	79
<b>Tabela 10.</b> Média de desenvolvimento da <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. em diferentes modelos de recipientes de vidro.....	81

<b>Tabela 11.</b> Média do número de brotos por explante de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. cultivados em diferentes sistemas de imersão temporária (RITA <sup>®</sup> , RALM <sup>®</sup> e BIT <sup>®</sup> ) e em frascos tradicionais (semissólido).....	83
<b>Tabela 12.</b> Médias de altura e enraizamento de brotos de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f cultivados em diferentes biorreatores de imersão temporária (RITA <sup>®</sup> , RALM <sup>®</sup> e BIT <sup>®</sup> ) e em frascos tradicionais (semissólido), durante a fase de alongamento.....	84
<b>Tabela 13.</b> Percentual de sobrevivência e média da altura de mudas de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. aclimatizadas em diferentes substratos (SC – substrato comercial e FC – fibra de coco) combinados em variadas proporções.....	85

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Percentual de sobrevivência de brotações de <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. e <i>Vanilla planifolia</i> Jack ex. Andrews conservadas <i>in vitro</i> , após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meios de cultivo suplementados com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).....	102
<b>Tabela 2.</b> Média de desenvolvimento de brotações de e <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. e <i>Vanilla planifolia</i> Jack ex. Andrews conservadas <i>in vitro</i> , após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meios de cultivo suplementados com sacarose (sac)e/ou sorbitol (sor).....	103
<b>Tabela 3.</b> Percentual de sobrevivência de brotações de espécies de baunilha, <i>Vanilla planifolia</i> Jacks ex. Andrews e <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f., conservadas <i>in vitro</i> , após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).....	104
<b>Tabela 4.</b> Média de desenvolvimento de brotações de espécies de baunilha, <i>Vanilla planifolia</i> Jacks ex. Andrews e <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f., conservadas <i>in vitro</i> , após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).....	105
<b>Tabela 5.</b> Quantidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila A, clorofila B e carotenóides presente em folhas debrotações de espécies de baunilha, <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f. e <i>Vanilla planifolia</i> Jack ex. Andrews, conservadas <i>in vitro</i> , após 12 meses, sobdiferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).....	107

**Tabela 6.** Quantidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila A, clorofila B e carotenóides presente em folhas de brotações de espécies de baunilha, *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews e *Vanilla phaeantha* Rchb. f., conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).....108

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

**Quadro 1.** Teste de Reação Gram e caracterização morfológica de colônia, das bactérias endofíticas isoladas e purificadas, em meio de KH, com 72 horas de crescimento à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. Características morfológicas de colônia, na seguinte ordem: tamanho, cor, forma, borda, elevação.....72

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μmol</b>	Micromolar (unidade de medida de moles por volume)
<b>°C</b>	Graus Celsius (unidade de medida de temperatura)
<b>atm</b>	Atmosfera (unidade de medida de pressão)
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>AIB</b>	Ácido 3-indolbutírico
<b>AN</b>	Meio de cultura Ágar Nutriente
<b>ANA</b>	Ácido naftaleno acético
<b>BAP</b>	6-benzilaminopurina
<b>BOD</b>	Câmara de crescimento - <i>Refrigerated Biological Incubator</i>
<b>CATIE</b>	<i>Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza</i>
<b>cm</b>	Centímetro (unidade de medida de comprimento)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DMF</b>	Dimetilformamida - N,N-Dimethylmethanamide
<b>FAO STAT</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FC</b>	Fibra de coco
<b>g</b>	Gramma (unidade de medida de massa)
<b>IRAM</b>	<i>Institut de Recherches Agronomiques</i>
<b>IRAT</b>	<i>Institut de Recherches Agronomiques Tropicales</i>
<b>ISSR</b>	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
<b>KH</b>	Meio de cultura formulado por Kado e Heskett (1970)
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>L</b>	Litro (unidade de medida de volume)
<b>m</b>	Metro (unidade de medida de comprimento)
<b>mg</b>	Miligramas (unidade de medida de massa)
<b>mL</b>	Mililitro (unidade de medida de volume)
<b>mm</b>	Milímetro (unidade de medida de comprimento)
<b>MS</b>	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
<b>mT</b>	Meta-topolina
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NCIB</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NRCS</b>	<i>National Research Centre for Spices</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>s</b>	Segundos (unidade de medida de tempo)
<b>SC</b>	Substrato comercial
<b>T</b>	Tratamento

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Família Orchidaceae	21
2.1.1	Subfamília Vanilloideae	22
2.2	Importância econômica da baunilha	25
2.3	Propagação da baunilha	27
2.3.1	Estaquia	27
2.3.2	Micropropagação	27
2.4	Contaminação microbiana <i>in vitro</i>	30
2.5	Biorreatores	31
2.6	Conservação de germoplasma	32
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	CAPÍTULO I	45
	RESUMO	46
	ABSTRACT	47
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de baunilha	50
2.1.1	Planta matriz	50
2.1.2	Desinfestação e inoculação em meio de cultura para estabelecimento <i>in vitro</i>	50
2.1.3	Teste de fitotoxicidade da Ampicilina Sódica em baunilha	51
2.1.4	Limpeza de microrganismos endofíticos em baunilha com o auxílio da Ampicilina Sódica	51
2.2	Identificação de bactérias endofíticas em <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f.	52
2.3	Multiplicação <i>in vitro</i> de espécies de baunilha	55
2.3.1	Efeito de diferentes consistências do meio de cultivo (semissólida, dupla-fase e líquida) na multiplicação <i>in vitro</i> de baunilha	55
2.3.2	Efeito do uso de diferentes modelos de recipientes de cultivo na multiplicação de baunilha	56
2.3.3	Multiplicação de brotações de baunilha em diferentes modelos de biorreatores	57
2.4	Enraizamento e aclimatização de plantas de baunilha	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59



3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de baunilha	59
3.1.1	Teste de fitotoxicidade da Ampicilina Sódica em baunilha	60
3.1.2	Limpeza de microrganismos endofíticos em baunilha com o auxílio da Ampicilina Sódica	61
3.1.3	Taxa de multiplicação clonal acumulada <i>in vitro</i> de baunilha no período de limpeza bacteriana	67
3.2	Identificação de bactérias endofíticas em <i>Vanilla phaeantha</i> Rchb. f.	70
3.3	Multiplicação <i>in vitro</i> de espécies de baunilha	74
3.3.1	Efeito de diferentes consistências do meio de cultivo (semissólida, dupla-fase e líquida) na multiplicação <i>in vitro</i> de baunilha	74
3.3.2	Efeito do uso de diferentes modelos de recipientes de cultivo na multiplicação de baunilha	78
3.3.3	Multiplicação de brotações de baunilhas em diferentes modelos de biorreatores	79
3.4	Enraizamento e aclimatização de plantas de baunilha	82
4	CONCLUSÕES	85
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	CAPÍTULO II	92
	RESUMO	93
	ABSTRACT	94
1	INTRODUÇÃO	95
2	MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1	Conservação <i>in vitro</i>	97
2.1.1	Efeito de temperatura e carboidrato sobre o crescimento <i>in vitro</i> de espécies de baunilha	97
2.1.2	Análise de clorofila e carotenoides de plantas de baunilha conservadas <i>in vitro</i>	98
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1	Conservação <i>in vitro</i>	99
3.1.1	Efeito da temperatura e carboidratos sobre o crescimento <i>in vitro</i> de espécies de baunilha	99
3.1.2	Análise de clorofila e carotenoides de plantas de baunilha conservadas <i>in vitro</i>	104
4	CONCLUSÕES	108
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	ANEXO I	112

## 1 INTRODUÇÃO

A baunilha ou vanila é uma planta do gênero *Vanilla*, pertencente à família Orchidaceae. Ele comporta aproximadamente 121 espécies, algumas ameaçadas de extinção por causa da destruição de seus habitats naturais, especialmente nas regiões tropicais das Américas, principalmente, no México (DIVAKARAN; BABU; PETER, 2006; IUCN, 2022; POWO, 2023).

A baunilha é uma planta herbácea de hábitos trepador e perene. Seu fruto, chamado de fava, é uma vagem alongada de grande importância econômica. A partir da fermentação dos frutos se obtém um flavonoide (vanilina – 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) que intensifica o sabor e aroma dos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Além da importância para a gastronomia, os frutos da baunilha também são utilizados na produção de medicamentos, cosméticos, artesanato, produtos de tabacaria, entre outros (LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008).

Apesar do Brasil apresentar condições favoráveis para o cultivo da baunilha, a produção é baixa e dispendiosa com as técnicas de propagação convencionais. Normalmente, a baunilha é propagada por meio de estaquia, mas esse método é dispendioso por gerar prejuízo a planta matriz, além de ser lento e não suprir a demanda do comércio (GANTAIT; KUNDU, 2017). Além disso, as sementes da maioria das Orchidaceae, incluindo as de baunilha, apresentam baixa taxa de germinação em condições naturais (SILVA, 2005).

Nesse contexto, é importante o desenvolvimento de protocolos e técnicas para produção em larga escala de baunilha para suprir a demanda comercial das diferentes espécies. A cultura *in vitro* se torna uma ferramenta viável para suprir essa demanda. Sua utilização pode proporcionar a produção em larga escala de mudas, com economia de tempo e espaço. Além disso, tem condições de uniformizar a produção quanto ao desenvolvimento das mudas, mantendo as características genéticas da planta matriz, gerando mudas de qualidade e livres de doenças, além de proporcionar a criação de coleções de trabalho ou de germoplasma *in vitro* (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003). Para se ter sucesso no processo deve-se atentar para quatro fases importantes: o estabelecimento da cultura asséptica *in vitro*; a multiplicação dos brotos; o enraizamento; e a aclimação das mudas sob condições *ex vitro* (GANTAIT; KUNDU, 2017).

Para Murashige (1974), o estabelecimento consiste na seleção dos explantes, desinfestação e inoculação em meio de cultura nutritivo, sob condições assépticas; a multiplicação dos explantes consiste em sucessivas subculturas em meio específico para

multiplicação e, no enraizamento, as partes aéreas das culturas são transferidas para o meio específico para formação de raízes que após, são aclimatizadas em substrato ou solo. A escolha do explante deve ser realizada com cautela, pois influencia as respostas da cultura *in vitro*, determinando o sucesso da micropropagação (ARAÚJO; CARVALHO, 2005).

Um dos principais problemas da cultura *in vitro* de tecidos vegetais é a contaminação, exógena ou endógena, por bactérias, fungos e leveduras, podendo ser um fator limitante para o estabelecimento da cultura (LEIFERT *et al.*, 1994; RIBAS *et al.*, 2003; AYELE; TEFERA, 2018). Várias metodologias são empregadas no combate à contaminação da cultura de tecidos vegetais *in vitro*, como a melhoria da condição fitossanitária das plantas doadoras (LEIFERT *et al.*, 1994) e a esterilização superficial dos explantes com biocidas como etanol, hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio, nanopartículas de prata, dentre outros (ABDI *et al.*, 2008; CASSELLS, 2011). Às vezes, é necessária uma desinfestação com antibióticos, em casos de contaminantes endofíticos, para redução da carga bacteriana (FALKINER, 1997).

Uma das vantagens da propagação *in vitro* é a possibilidade de testar diferentes meios de cultura e a realização de ajustes de acordo com as necessidades de cada espécie. O estado físico do meio de cultura também deve ser levado em consideração já que os explantes podem ser cultivados em meio semissólido, líquido ou ainda dupla-fase. Nesse último, tem-se a junção do meio semissólido com o meio líquido e, de acordo com Scherwinski-Pereira e Fortes (2003) e Oliveira *et al.* (2013), o meio dupla-fase pode proporcionar um aumento na taxa de multiplicação e alongamento das mudas, pois o meio líquido apresenta uma maior disponibilidade de nutrientes aos explantes em cultivo.

Para melhorar a eficiência da propagação *in vitro*, sistemas semiautomatizados também podem ser utilizados. Biorreatores têm auxiliado na produção de mudas de várias espécies, com a vantagem de proporcionar a produção em larga escala em um menor intervalo de tempo. Originalmente, biorreatores foram desenvolvidos para serem utilizados na cultura de células, como o objetivo de ser empregado em trabalhos de fermentação e produção de metabólitos secundários (FUMAGALI *et al.*, 2008; GOMES, 2016; ROSSIA *et al.*, 2019). Nos últimos anos, o sistema foi adequado também para o cultivo de explantes vegetais (GEORGIEV *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2016).

O tipo de biorreator mais utilizado na propagação *in vitro* de baunilhas é o sistema de imersão temporária, desenvolvido para contornar problemas da cultura de tecidos de plantas, como a hiperhidricidade e os altos custos de produção (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016). No Brasil, o mais conhecido é o BIT®, biorreator de imersão

temporária, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Segundo Gomes *et al.* (2016) e Teixeira, Marbachr e Santos (2002) as vantagens desse modelo de biorreator são: a possibilidade da utilização de diferentes tipos de frascos; a possibilidade de se utilizar da imersão temporária ou permanente; a possibilidade de cultivo de gemas, brotos e raízes, além das células e embriões. Adicionam-se a essas vantagens, a possibilidade da utilização de fontes artificiais de ar e CO<sub>2</sub> em dosagens específicas (TEIXEIRA; MARBACHR; SANTOS, 2002) e a facilidade de se realizar testes de fidelidade genética do material propagado por técnicas moleculares, como os do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que apresenta uma boa reprodutibilidade e não precisa de *primers* específicos (NOGUEIRA; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2019).

Nesse contexto, o presente trabalho busca aperfeiçoar técnicas e protocolos para a propagação *in vitro* de espécies do gênero *Vanilla* (*V. phaeantha* e *V. planifolia*) para produção de mudas em larga escala. Para tanto, pretendeu-se desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro*, combatendo contaminações por microrganismos endofíticos; avaliar o uso de sistemas de meio semissólido, meio líquido e dupla-fase na multiplicação *in vitro* de espécies de baunilhas; avaliar o potencial de diferentes frascos para otimizar a multiplicação *in vitro*; estabelecer um protocolo para a multiplicação de baunilhas em biorreatores de imersão temporária; definir substratos para aclimatização das mudas produzidas em laboratório, além de estabelecer um protocolo para a conservação *in vitro* de acessos das espécies de baunilha em estudo.

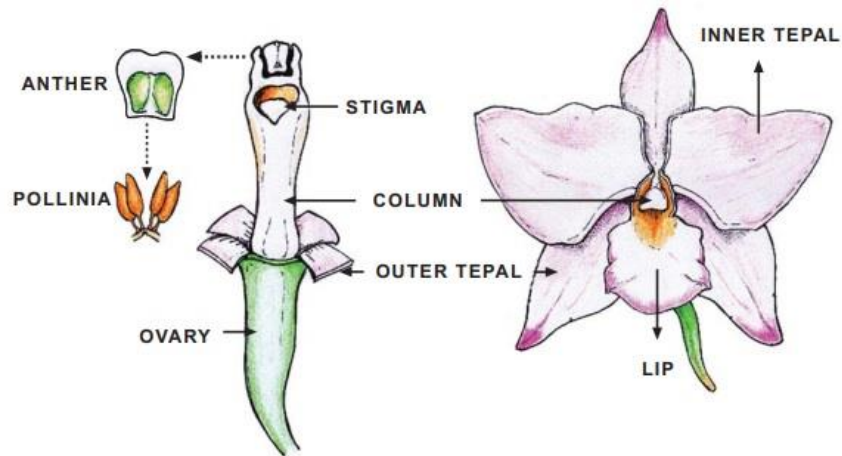
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias dentre as Angiospermas (DRESSLER, 1993). Formada por cerca de 735 gêneros e mais de 26.454 espécies distribuídas por todo o mundo, com maior diversidade nos trópicos (CHASE *et al.*, 2015). No Brasil são encontrados 249 gêneros e 2.662 espécies da família (REFLORA, 2020).

Segundo Pabst e Dungs (1975) e Barros (1996), no Brasil, ocorrem 191 gêneros constituídos de aproximadamente 2.300 a 2.400 espécies. Dentre as orquídeas, sua maioria é epífita, mas existem espécies rupícolas, terrícolas, palustres e mico-heterotróficas. Isso faz com que possam ser encontradas em diferentes formações vegetais e diferentes tipos de ambientes (HOEHNE, 1949). Ainda segundo Hoehne (1949) e Pansarin e Pansarin (2008), caules formando pseudobulbos, folhas carnosas, raízes dotadas de velame e o próprio crescimento em touceiras, permitindo o acúmulo de matéria orgânica, são algumas das estratégias adotadas pelas orquídeas para se adaptar a diferentes ambientes.

A estruturação floral das orquídeas costuma ser uniforme quanto ao número de estruturas e seu arranjo. O surgimento de estruturas complexas se dá aos detalhes na forma e tamanho dos componentes básicos. De acordo com Aceto e Gaudio (2011), as flores em Orchidaceae são geralmente zigomorfas, com três sépalas e duas pétalas laterais, mais uma pétala central medial diferenciada em labelo (Figura 1). Os órgãos reprodutivos masculinos (filete e anteras) e femininos (estilete e estigmas) são fundidos em uma estrutura denominada coluna, com uma ou mais anteras e uma região estigmática formada pela fusão dos três estigmas; abaixo da coluna está o ovário (RUDALL; BATEMAN, 2002; ACETO; GAUDIO, 2011). Os grãos de pólen, na maioria das orquídeas, são reunidos em duas ou mais polínias que formam o polinário (TREMBLAY, 1992).



**Figura 1.** Diagrama esquemático de uma flor de orquídea. Anther: antera. Column: coluna. Inner tepal: pétala interna. Lip: labelo. Outer tepal: sépala externa. Ovary: ovário. Pollinia: polínia. Stigma: estigma. Fonte: Aceto e Gaudio (2011).

A família Orchidaceae, de acordo com Dressler (1993), está dividida em cinco subfamílias – Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Spiranthoideae e Orchidoideae, classificadas principalmente com relação ao número e a posição da antera. Após análises genéticas e de caracteres morfológicos, Spiranthoideae e Orchidoideae passaram a ser consideradas como uma única subfamília – Orchidoideae, e Epidendroideae foi desmembrada surgindo a subfamília Vanilloideae (CAMERON *et al.*, 1999; PRIDGEON *et al.*, 1999; ABREU; NETO, 2010).

### 2.1.1 Subfamília Vanilloideae

A subfamília Vanilloideae é composta por 15 gêneros distribuídos em aproximadamente 175 espécies, distribuída amplamente por todo o mundo (PRIDGEON *et al.*, 1999). Segundo Pridgeon *et al.* (2003), Vanilloideae é dividida em duas tribos – Pogonieae e Vanilleae.

Destacam-se, morfológicamente, por possuírem antera incumbente, apenas um estame fértil, grãos de pólen agregados, porém não formando polínias (DRESSLER, 1993; CAMERON *et al.*, 1999; PRIDGEON *et al.*, 1999).

### 2.1.1.1 Gênero *Vanilla*

O gênero *Vanilla* Plumier ex. Mill (1754) compreende cerca de 140 espécies, das quais a maioria é inexplorada científica e economicamente, sendo considerado o gênero mais rico e diverso dentre todos os gêneros da tribo Vanilleae (STERN; JUDD, 1999; GALLAGE; MOLLER, 2018; KARREMANS *et al.*, 2020). Descoberto no México, as espécies desse gênero ocorrem em regiões de clima quente, úmido e tropical (CHILDERS, 1959). Pertencente a uma das mais antigas linhagens de orquídeas, *Vanilla* apresenta uma diversificação lenta (GIVNISH *et al.*, 2015). Elas são espécies amplamente encontradas nas regiões tropicais das Américas, África e Ásia, não sendo restritas a um único país e casos de endemismos são muito raros no gênero (KARREMANS *et al.*, 2020).

Segundo Karremans *et al.* (2020), estudo sobre diversidade do gênero *Vanilla* mostra que várias espécies descritas recentemente representam apenas extensões da distribuição de espécies descritas anteriormente, consequentemente reduzindo o número de espécies de 140 para aproximadamente 121 espécies (POWO, 2023).



**Figura 2.** Distribuição geográfica de espécies do gênero *Vanilla*. Fonte: Gantait e Kundu (2017).

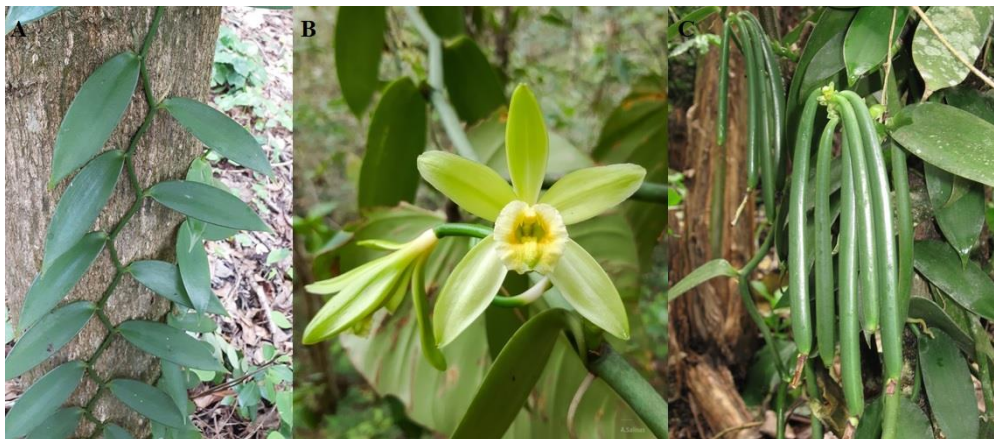
As plantas do gênero costumam apresentar hábito trepador, podendo ser terrestres ou hemiepífitas; são plantas clorofiladas, com caule liso e suculento, escandente e reptante, que se adere às árvores com o auxílio de raízes adventícias; as folhas são alternas, espaçadas, largas, carnosas e brilhantes; as flores se dão em inflorescências axilares, com flores solitárias ou em racemos, vistosas, perfumadas e efêmeras, com sépalas e pétalas livres; o labelo pode estar livre ou fundido à coluna; a coluna apresenta antera terminal, sem

formação de polínias; e o fruto em formato de vagem é carnosos, com sementes crustáceas (ACKERMAN, 2003; PRIDGEON *et al.*, 2003).

#### 2.1.1.1.1 Espécies *Vanilla planifolia* Jack. ex Andrews

É a espécie mais reconhecida no mundo, descrita pela primeira vez no México, e é considerada a principal espécie cultivada ao redor do mundo (HOEHNE, 1945), estando ameaçada de extinção (IUCN, 2022).

De acordo com Hoehne (1945), a espécie costuma apresentar caule robusto, roliço, escandente, verde-escuro; folhas crasso-carnosas, com pecíolo curto, limbo plano, oblongo-lanceolado; racemo floral axilar, com 8-19 flores; flores verde-amarelas ou amarelo-oliváceas; pétalas parecidas com as sépalas, sendo um pouco mais estreitas e levemente mais curtas; labelo na metade inferior fundido à coluna, levemente trilobado, na face anterior apresentando pilosidade; frutos retos ou levemente arcados, aromáticos, quase cilíndricos; sementes negro-brilhantes, ovoide-globulares.



**Figura 3.** *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. A – Estrutura vegetativa (caule e folhas). B – Estrutura reprodutiva (flor). C – Fruto. Fonte: inaturalist.org (A – Lee-Roy Estrale; B – Ariel Salinas Seq.; C – Kinardo Flores Castro).

#### 2.1.1.1.2 Espécie *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

A espécie foi descrita pela primeira vez em Cuba, no ano de 1865. É uma espécie amplamente distribuída nas regiões tropicais das Américas, como ao sul dos Estados Unidos, no México, Costa Rica, Panamá, Cuba, Jamaica, República Dominicana, Martinica, Trinidad & Tobago, Colômbia, Venezuela e Brasil (KARREMANS *et al.*, 2020; POWO, 2023).



Ainda segundo Karremans *et al.* (2020), no Brasil a espécie foi descrita como *Vanilla bahiana* Hoehne, uma espécie distinta, por possuir flores menores com labelo trilobado mais definido (SOTOARENAS; CRIBB, 2010), nativa de distribuição restrita à costa xerófila da Caatinga. Posteriormente, *V. bahiana* foi considerada sinônimo de *V. phaeantha* por não apresentar características morfológicas consistentes que a difere da outra espécie (KARREMANS *et al.*, 2020).

Conforme Hermoso (2015), a espécie apresenta caule suculento, rastejante, pendente com raízes adventícias e folhas alternas, crassas, estreitas, elípticas e paralelinérveas, entrenós mais compridos do que as folhas. Sua inflorescência em forma de racemo pode comportar até 31 flores de coloração pálida. Seu fruto em forma de vagem contém sementes crustosas (PRIDGEON *et al.*, 2003).



**Figura 4.** *Vanilla phaeantha* Rchb.f. A – Estrutura reprodutiva (flor). B – Estrutura vegetativa (caule e folhas). C – Fruto. Fonte: acervo pessoal (A – Mariana Oliveira Medeiros; B e C – Márcia José Ribeiro).

## 2.2 Importância econômica da baunilha

A baunilha tem uma grande importância para economia sendo considerada a segunda especiaria mais cara, depois do açafrão (BRAMEL; FREY, 2021). De seu fruto é extraído um composto orgânico (vanilina: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) que é amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, dentre outras, com a finalidade de intensificar aromas e sabores, além de terapêutica (HOMMA *et al.*, 2006;

LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013; FERRARA, 2019; BRAMEL; FREY, 2021).

De acordo com Brumano (2019), no Brasil existem comunidades em diferentes regiões que se beneficiam do extrativismo da baunilha, tornando a produção orgânica e artesanal, livre de normas e padrões preestabelecidos, mas que não atende a demanda comercial. O extrativismo foi e continua sendo importante para o crescimento e desenvolvimento de comunidades, mas se deve pensar no futuro da região que está sendo exercida essa prática, muitas vezes a criação de reservas extrativistas não garante a conservação e preservação dos recursos naturais, podendo levar ao esgotamento dos recursos (HOMMA, 2012). Ainda segundo Homma (2012), precisa-se domesticar e conservar produtos extrativistas que não atendem à demanda comercial, para evitar prejuízos aos produtores e consumidores.

A produção de baunilha é uma das principais fontes de renda para agricultura familiar de alguns países. O preço de suas vagens, curadas, já chegou a custar entre U\$ 400/kg e U\$500/kg no mercado internacional, mas vem caindo desde 2019 com o aumento da colheita em países como Madagascar e Indonésia, chegando a custar até 60% menos que em 2018 (AUST; HACHMANN, 2020; BRAMEL; FREY, 2021). Segundo Bramel e Frey (2021), os maiores produtores de baunilha nos últimos anos, de acordo com o FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), foram Madagascar (65% da produção mundial), seguido de Indonésia, China, Papua Nova Guiné, México, Turquia, Tonga, Uganda, Polinésia Francesa e Comores. Enquanto Madagascar é o maior exportador de baunilha, os maiores importadores do produto são Estados Unidos, França, Reino Unido, Alemanha e Canadá (CHAKIB, 2019).

Mesmo com a alta na colheita em alguns países, a produção anual da baunilha ainda é baixa, não supre a demanda do comércio mundial, e isso está ligado principalmente à dificuldade na produção da baunilha. Além de gerar uma baixa produtividade, o modo de cultivo da baunilha é dispendioso, necessita de mão de obra especializada e intensiva, já que o sistema de cultivo é tradicional, totalmente manual e lento (GANTAIT; KUNDU, 2017; BRAMEL; FREY, 2021).

A maioria das culturas de baunilha é composta por clones derivados do morfotipo “Mansa” (BORY *et al.*, 2008). Por causa da intensa propagação vegetativa, essas culturas apresentam baixa variação genética, tornando-as mais vulneráveis a fatores bióticos e abióticos (SOTOARENAS, 1999; MINOO *et al.*, 2007; BAUTISTA-AGUILAR *et al.*, 2021). Segundo Farreyrol *et al.* (2010), isso tem gerado perdas de produção e plantios.

## 2.3 Propagação da baunilha

### 2.3.1 Estaquia

A baunilha normalmente é propagada por estacas de caule, onde o tamanho de cada estaca depende da quantidade do material vegetal das plantas matrizes. A cada nó (gema) pode se desenvolver uma nova planta. Normalmente se utilizam estacas com pelo menos duas gemas, quanto maior a estaca, mais rápido é o estabelecimento e seu desenvolvimento (DECKER, 1956; HOMMA *et al.* 2006; UCHIDA, 2011; ANJOS, 2020). Ainda, segundo os autores, as estacas são mantidas em ambiente úmido e sombrio, após o plantio que se dá pelo enterramento de pelo menos uma gema, e demoram de 2 a 3 meses para começarem a emitir os primeiros brotos.

De acordo com Homma *et al.* (2006), o tempo para primeira floração após o plantio é de aproximadamente 3 anos, e da floração até a colheita o tempo é de 8 a 9 meses. Assim, o processo é demorado, trabalhoso e pode dificultar e encarecer sobremaneira a produção comercial (MENGESHA *et al.*, 2012; GANTAIT; KUNDU, 2017).

### 2.3.2 Micropropagação

Como já citado neste trabalho, a produção convencional de mudas de baunilha é onerosa, inclusive sendo prejudicial para a planta matriz e, muitas vezes, não suprimindo a demanda do mercado. Para multiplicação em larga escala e distribuição de mudas, além de conservação de germoplasma, a propagação por meio da cultura de tecidos *in vitro* é uma das alternativas mais viáveis (MENGESHA *et al.*, 2012; GANTAIT; KUNDU, 2017; KENDON *et al.*, 2017; BAUTISTA-AGUILAR *et al.*, 2021).

A micropropagação pode gerar uma produção em larga escala de mudas utilizando uma pequena quantidade de material, a partir de tecidos e órgãos de plantas matrizes, mantendo a identidade genética do material propagado (MENEZES *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2017). A técnica é executada em condições assépticas, com meios de cultura específicos para cada espécie, em ambiente controlado quanto à luminosidade e temperatura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SINGH *et al.*, 2013).

De acordo com Nogueira *et al.* (2017), a micropropagação possui cinco etapas importantes: seleção de plantas matrizes, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização.

Plantas matrizes são plantas doadoras de explantes para estabelecimento *in vitro*. É importante selecionar plantas sadias e de boa procedência, preferencialmente, plantas

mantidas em coleções de germoplasmas, ou em ambientes onde se consiga ter o mínimo de cuidados fitossanitários (LEIFERT *et al.*, 1994; ORLIKOWSKA *et al.*, 2017). Segundo Nogueira *et al.* (2017), plantas coletadas em campo podem servir como plantas matrizes doadoras de explante, porém são mais propícias à contaminação durante o estabelecimento *in vitro*, por estarem mais expostas às condições ambientais naturais, sem um controle fitossanitário.

Para o estabelecimento *in vitro* de baunilha, costumam ser usados, como explantes, seguimentos nodais (gema apical e lateral), ou qualquer outro explante que contenha tecido meristemático capaz de se diferenciar. Para dar início ao estabelecimento *in vitro*, é necessário submeter os explantes a um processo de desinfestação, para evitar contaminação bacteriana e fúngica vinda do ambiente externo. Para desinfestação, vários protocolos com agentes antissépticos são adotados, os mais utilizados estão o etanol 70%, e o hipoclorito de sódio em concentrações variadas (GARCIA-RAMIREZ *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2009).

Após a desinfestação, os explantes são inoculados em meio de cultura, cuja composição do meio pode variar de acordo com as necessidades de cada espécie (DUTRA *et al.*, 2009). Em seguida, são mantidos em ambiente controlado. O meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é frequentemente utilizado para o estabelecimento de diferentes espécies.

Na multiplicação, o objetivo é gerar o máximo de plantas possíveis em um curto período. Para isso são necessários protocolos eficientes para que as plantas desenvolvam parte aérea homogênea e apresentem boa qualidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A partir do estabelecimento bem executado, explantes são retirados e inoculados em meio de cultura para multiplicação, que pode conter combinações de reguladores de crescimento das classes das citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP) e meta-Topolina (mT), e auxinas, como ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido indol-3-acético (AIA), dependendo da espécie propagada (CALDAS *et al.*, 1998; DUTRA *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2017). Segundo Nogueira *et al.* (2017), são necessários subcultivos devido ao esgotamento dos componentes do meio de cultura, como carboidrato, sais minerais e vitaminas. O tempo de subcultivo também vai depender da espécie propagada, mas é importante direcionar atenção para a renovação do meio de cultura para evitar a morte de tecidos (NEGI; SAXENA, 2011), podendo estar relacionada ao

acúmulo de compostos, como o etileno e os polifenóis, que são prejudiciais em níveis elevados.

O meio de cultura pode apresentar diferentes consistências, como líquida, semissólida ou até a combinação dos dois (dupla-fase). Os meios de cultura líquidos têm apresentado bons resultados para a micropropagação de diversas espécies vegetais (RAMANAYAKE *et al.*, 2008; DEVI *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2017). De acordo com Siqueira *et al.* (2013), o meio líquido é de fácil preparo e mais barato, além de ser mais homogêneo facilitando o processo de difusão de componentes. Caldas *et al.* (1998) afirmam que quando o meio é de consistência semissólida, a área de absorção de nutrientes pela planta acontece apenas onde há contato entre meio e planta, podendo gerar um desenvolvimento menor. Segundo Scherwinsky-Pereira e Fortes (2003) e Oliveira *et al.* (2013), o meio dupla-fase pode aumentar a taxa de multiplicação e alongamento das mudas, pois o meio líquido apresenta uma maior disponibilidade de nutrientes aos explantes em cultivo, como também afirmam Siqueira *et al.* (2013).

O enraizamento é necessário para formação de um sistema radicular bem desenvolvido e funcional para que a planta consiga sobreviver e se desenvolver quando for para o ambiente *ex vitro* (NOGUEIRA *et al.* 2017).

Para que a planta desenvolva um sistema radicular apropriado, na maioria das vezes, é necessário o uso de reguladores de crescimento como o AIA, AIB e ANA. Essas auxinas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinações, em concentrações variadas, dependendo da espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A luminosidade também pode influenciar no desenvolvimento radicular, podendo ocasionar a redução de AIA, e o aumento da quantidade de fenóis que inibem o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A última fase da micropropagação, a aclimatização, pode ser considerada a mais crítica, visto que é a planta que se desenvolveu dentro de um vidro sob condições controladas, passa a enfrentar o ambiente externo ao vidro com todas as condições ambientais naturais, baixa umidade, alta luminosidade, variação de temperatura, dentre outras. Segundo Schuck *et al.* (2012), a mudança do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* deve ocorrer de forma gradativa e controlada, evitando e reduzindo o estresse causado pela diferença entre os ambientes.

Promover uma fase pré-aclimação, para que a planta se adapte às dificuldades, como luminosidade alta, baixa umidade, e variações de temperaturas, e ao substrato, antes de ir para o campo pode ser importante (BERILLI *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2015), visto

que a planta de cultura *in vitro* apresenta folhas geralmente mais finas, fracas e fotossinteticamente pouco ativas, não adaptadas ao ambiente *ex vitro*.

A composição do substrato também é um fator importante para o sucesso da aclimatização, suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou dificultar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas jovens (NOGUEIRA *et al.*, 2017). O substrato deve promover um bom desenvolvimento durante o processo, resultando em mudas de qualidade, em menor tempo e a custo baixo (BERILLI *et al.*, 2011). Segundo Lima *et al.* (2007), o substrato precisa ter boa coesão entre as partículas e boa aderência junto às raízes, associado à elevada capacidade de retenção de água (SCHUCK *et al.*, 2012), já que mudas oriundas de micropropagação *in vitro* não toleram estresse hídrico na fase de aclimatização.

#### 2.4 Contaminação microbiana *in vitro*

A maioria das orquidáceas, incluindo o gênero *Vanilla*, dependem de interações com microrganismos endofíticos, como fungos e bactérias, para seu desenvolvimento *ex vitro* (LOZANO, 2014, FLANAGAN *et al.*, 2018). E a contaminação por esses microrganismos é um dos principais problemas enfrentados na cultura de tecidos vegetais, dificultando o estabelecimento da cultura *in vitro*. Os microrganismos contaminantes competem pelos nutrientes do meio de cultura, eliminando no meio metabólitos tóxicos, podendo ocasionar a morte do explante (PEREIRA *et al.*, 2003; AYELE; TEFERA, 2018). Com o objetivo de prevenir ou eliminar bactérias do cultivo *in vitro*, são utilizados alguns antibióticos de amplo espectro como ampicilina, eritromicina e cloranfenicol, no meio de cultura (HOLFORD; NEWBURY, 1992; FALKINER, 1997; MAMIDALA; NANNA, 2009), e outros químicos, como etanol, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio, na desinfestação durante o estabelecimento *in vitro* (CASSELLS, 2011; ORLIKOWSKA *et al.*, 2017).

Enquanto esses microrganismos dificultam o cultivo *in vitro*, segundo Melnick *et al.* (2012), no campo, eles ajudam a planta de diversas formas, podendo diminuir casos de herbivoria, melhorar o crescimento, desencadear uma cascata de defesa contra certas doenças, entre outras. Um outro exemplo, onde microrganismos endofíticos agem a favor das baunilhas, é na proteção e combate contra o *Fusarium oxysporum*, fungo que ataca as raízes das baunilhas podendo levar a morte da planta. De acordo com Jiménez-Quesada *et al.* (2014), uma cepa bacteriana de origem endofítica que habita espécies de baunilhas é uma forte candidata a responder ao ataque do patógeno *Fusarium oxysporum*. Estudos

mostram que a presença de certo microrganismo endofítico em vagens maduras pode estar relacionada ao aumento significativo das quantidades de vanilina e outros compostos responsáveis pelo sabor (KHOYRATT *et al.*, 2018; FLANAGAN *et al.*, 2018). Por essas razões é importante a identificação e armazenamento dessas bactérias, pois algumas podem exercer papéis fundamentais no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas sob condições de campo. Ainda, a identificação pode melhorar o protocolo de combate às bactérias na cultura *in vitro*, evitando a ocorrência de resistência a antibióticos.

## 2.5 Biorreatores

Atualmente estão sendo utilizados sistemas de biorreatores para otimização do processo de produção de mudas em larga escala na cultura *in vitro*. São equipamentos que podem ser utilizados com sistema de imersão temporária ou permanente de explantes vegetais com a finalidade de produção em larga escala de mudas de diversas espécies, incluindo espécies de baunilhas (TEIXEIRA, 2006; DUTRA *et al.*, 2009; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016). O sistema de biorreatores utiliza meio líquido, que como já citado, é de rápido preparo e de baixo custo, proporcionando maior homogeneidade de nutrientes, melhorando o aproveitamento nutricional pelas plantas, conseqüentemente incrementando a produtividade e eficiência no processo de propagação (PENCHEL *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2009; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016).

O uso de sistema de imersão temporária vem sendo estudado, também, na propagação de orquídeas, por exemplo, para multiplicação de *Potinera* (TISSERAT; VANDERCOOK, 1985), *Phalaenopsis* (YOUNG *et al.*, 2000), *Oncidium* (YANG *et al.*, 2010) e *Vanilla planifolia* (RAMOS-CASTELLÁ *et al.*, 2014; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016). Segundo Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016), o sistema RITA<sup>®</sup>, sistema de imersão completo acionado por transferência pneumática de meio líquido, sem necessidade de renovação do meio, é o modelo de melhor desempenho sendo usado para micropropagação em larga escala de várias espécies de plantas, porém o sistema BIT<sup>®</sup> apresentou resultados satisfatórios e com baixo custo, sendo de melhor custo-benefício.

## 2.6 Conservação de germoplasma

Existem duas formas de conservação de recursos genéticos vegetais: *in situ*, quando se tem a planta conservada em condições naturais em seu processo evolutivo e *ex situ*, onde se retira partes da planta para ser conservada de forma artificial, por exemplo, a coleção *in vitro* (NICK *et al.*, 2010; KAPAI *et al.*, 2010). De acordo com Veiga *et al.* (2006), a conservação *ex situ* possui várias modalidades, como a conservação *in vitro*, coleções de campo, em câmaras frias e em nitrogênio líquido (criopreservação). A criopreservação é uma estratégia para conservação a longo prazo de espécies de interesse medicinal, agroflorestal, horticultural e biotecnológico (KELLER *et al.*, 2013), pois reduz consideravelmente o metabolismo, mantendo o material intacto, e as estabilidades fisiológica e genética conservadas (ENGELMANN, 2004). A conservação *in vitro* é um método utilizado para espécies que apresentam propagação vegetativa ou sementes recalcitrantes (MATSUMOTO *et al.*, 2010). De acordo com Santos e Bettencourt (2002), na atualidade, os recursos genéticos são conservados em bancos e coleções de germoplasma de uso imediato ou com potencial para uso futuro.

A conservação de espécies de baunilha é de grande importância e interesse, por vários fatores já citados nessa revisão, como a questão de a cultura mundial ser basicamente constituída por clones com baixa variabilidade genética que possuem alta vulnerabilidade a fatores bióticos e abióticos, como é o caso de ataques pelo patógeno *Fusarium oxysporum*, que causam perda de produção (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016). Segundo SotoArenas (1999) e Bory *et al.* (2008), o *pool* gênico de *V. planifolia*, em seu hábitat original, está ameaçado por causa do desmatamento, coleta excessiva para estabelecimento de cultivos e manejo inadequado, levando populações silvestres à extinção.

Atualmente, a conservação *ex situ* é a melhor opção para preservar os recursos genéticos ainda existentes de baunilha e melhorar a sua produção (BORY *et al.*, 2008). O uso da cultura de tecidos vegetais para estabelecer um banco de germoplasma *in vitro* tem se mostrado como uma estratégia bastante eficaz na conservação de várias espécies, como *Solanum tuberosum* (GOPAL *et al.*, 2005), *Manihot esculenta* (BARRUETO; CARVALHO, 2008), espécies de baunilhas (BORY *et al.*, 2008), dentre outras (KENDON *et al.*, 2017), conservando exemplares livres de patógenos e genética conservada, em um espaço reduzido sob condições controladas durante vários meses, e até anos (CRUZ-CRUZ *et al.*, 2013). Já é possível encontrar algumas coleções já estabelecidas pelo mundo como, por exemplo, o IRAM (*Institut de Recherches Agronomiques à Madagascar*) e IRAT (*Institut de Recherches Agronomiques Tropicales*), em Madagascar; CATIE (*Centro*



*Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza*), em Turrialba, Costa Rica; NRCS (*National Research Centre for Spices*), em Calicut, Índia, além de alguns jardins botânicos pelo mundo que possuem exemplares em suas coleções (BORY *et al.*, 2008).

Para que se alcance o sucesso no processo de conservação, geralmente são necessários protocolos adaptados para cada espécie, com concentrações de carboidratos específicas, temperaturas mais baixas e intensidade luminosa específica, visto que o objetivo é diminuir o metabolismo retardando o crescimento (THAKUR *et al.*, 2015; TREJGEL *et al.*, 2015; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, G., SALEHI, H. & KHOSH-KHUI, M. (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 709-714.
- ABREU, N. L.; Neto, L. M. (2010). As subfamílias Vanilloideae e Orchidoideae (Orchidaceae) em um fragmento da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil. **Boletim De Botânica**, v. 28, n. 1, p. 15-33.
- ACETO, S.; GAUDIO, L. (2011) The MADS and the Beauty: Genes Involved in the Development of Orchid Flowers. **Current Genomics**, v. 12, n. 5, p. 342-56.
- ACKERMAN, J. (2003) **Vanilla en Flora of North America online**, v. 26.
- ANJOS, N. N. (2020) Barreiras de produção da Baunilha em STP. Évora: Universidade de Évora. **(Dissertação de Mestrado)**
- ARAÚJO, L.H.A.; CARVALHO, J.M.F.C. (2005) Técnicas de cultivo *in vitro*. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias. **(Programa de Pós-Graduação)**.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, p. 261-296.
- ATWOOD, J. T. (1986) The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**, v. 9, n. 1, p. 171-186.
- AUST; HACHMANN (2020) Vanilla market update - November 2020. **Aust&Hachmann**. Disponível em: < [www.austhachcanada.com/2020/11/06/november-2020/](http://www.austhachcanada.com/2020/11/06/november-2020/)>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.
- AYELE, Y.Z; TEFERA, W. (2018) Low-Cost Sterilization Technique and In vitro Initiation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Andr.). **Journal of Agricultural Science and Food Research**, Res 9: p. 227.
- BARÁNEK, M.; KRIZAN, B.; ONDRUSIKOVA, E.; PIDRA, M. (2010) DNA - methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 11-22.
- BARROS, F. (1996) Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 139-151.
- BARRUETO, L. P.; CARVALHO, C. B. (2008) Importance of abscisic acid (ABA) in the in vitro conservation of cassava (*Manihot esculentus*). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 68, p. 304–308.

- BAUTISTA-AGUILAR, J. R.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; RAMÍREZ- MOSQUEDA, M. A.; ORTIZ-GARCÍA, M. M. (2021) In vitro Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. **HortScience**, v. 56, n. 12, p. 1494–1498.
- BERILLI, S. S.; CARVALHO, A. J. C.; FREITAS, S. J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. S. (2011) Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 208-214.
- BORY, S.; GRISONI, M.; DUVAL, M. F.; BESSE, P. (2008) Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 551–571.
- BOUETARD, A.; LEFEUVRE, P.; GIGANT, R.; BORY, S.; PIGNAL, M.; BESSE, P.; GRISONI, M. (2010) Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 621-630.
- BRAMEL, P.; FREY, F. (2021) Global strategy for the conservation and use of *Vanilla* genetic resources. **Global Crop Diversity Trust**, Bonn, Germany.
- BRUMANO, C. N. (2019) A trajetória social da baunilha do Cerrado na cidade de Goiás/GO. Universidade de Brasília, Brasília. **(Dissertação de Mestrado)**
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v. 1, p. 183-260.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAMA, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 2, p. 208-224.
- CASSELLS, A. C. (2011) Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, **CRC Press**, cap. 17, p. 223-238.
- CHAKIB, A. (2019) Restitution de l'étude diagnostic de la filière vanilla Antananarivo. **Presentation to Salva Terra**.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. (2015) An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174.

- CHILDERS, N. F.; CIBES, H. R.; HERNANDEZ-MEDINA, E. (1959) Vanilla - The orchid of commerce. In: WITHNER, C. L. (Ed.) **The Orchids, a Scientific Survey**, Ronald press Company, New York, p. 477-508.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. (2013) **Biotechnology and conservation of plant biodiversity**, Resources, v.2, n. 2, p. 73-95.
- DECKER, J. S. (1956) **Cultura das orquídeas no Brasil**, São Paulo: Secretária Agricultura, Indústria e Comércio Estado de São Paulo. p. 251.
- DEVI, W. S.; BENGIELLA, L.; SHARMA, G. J. (2012) In vitro seed germination and micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro using seeds. **Biotechnology**.
- DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. (2006) Conservation of *Vanilla* species, in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 175-180.
- DRESSLER, R. L. (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. **Dioscorides Press**, Portland, p. 314.
- DUTRA, L. F.; WENDING, I.; BRONDANI, G. E. (2009) A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59.
- ENGELMANN, F. (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433.
- FALKINER, F. R. (1997). Antibiotics in Plant Tissue Culture and Micropropagation — What are We Aiming at?. In: Cassells, A.C. (eds) Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. **Developments in Plant Pathology**, v. 12. Springer, p. 155-160.
- FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. (2002) Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p. 489-492.
- FERRARA, L. (2019) Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*: A narrative review. **International Journal of Medical Reviews**, v. 7, n. 1, p. 22-26.
- FARREYROL, K.; GRISONI, M.; PEARSON, M.; RICHARD, A.; COHEN, D.; BECK, D. (2010) Genetic diversity of Cucumber mosaic virus infecting vanilla in French Polynesia and Reunion Island. Australas. **The Plant Pathology Journal**, v. 39, p.132-14.
- FLANAGAN, N. S.; CHAVARRIAGA, P.; MOSQUERA-ESPINOSA, A. T. (2018) Conservation and Sustainable Use of Vanilla Crop Wild. In: HAVKIN-FRENKEL, D.; and BELANGER, F. C. Handbook of Vanilla Science and Technology. **John Wiley & Sons Ltd**, ed. 2, p. 85-109.

- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. (2008) Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 627-641.
- GALLAGE, N. J.; MØLLER, B. L. (2018). Vanilla: The Most Popular Flavour. In: SCHWAB, W.; LANGE, B.; WÜST, M. (eds) *Biotechnology of Natural Products*. Springer, p. 3-24.
- GANTAIT, S.; KUNDU, S. (2017) In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 9, p. 1-19.
- GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; FREIRE-SEIJO, M.; FAJARDO, L.; TEJEDA, M.; REYES, M. (2007) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var Vittata. **Biotecnología vegetal**, v. 7, n. 3, p. 153-158.
- GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering Life Sciences**, v. 14, p. 606–621.
- GIGANT, R.; BORY, S.; GRISONI, M.; BESSE, P. (2011) Biodiversity and evolution in the *Vanilla* genus. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (Eds.) **The dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution**, Intech, Rijeka. p. 1-26.
- GIVNISH, T. J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S. P.; HUNTER, S. J.; ZULUAGA, A.; DOUCETTE, A.; CARO, G. G.; MCDANIEL, J.; CLEMENTS, M. A.; ARROYO, M. T. K.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; WILLIAMS, N. H.; CAMERON, K. M. (2015) Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. **Journal of Biogeography**, v. 43, p. 1905-1916.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2016) Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249.
- GOMES, H. T. (2016) Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária. Brasília: Universidade de Brasília-UnB. **(Tese de doutorado)**.
- GOPAL, J.; CHAMAIL, A.; SARKAR, D. (2005) Uso de microtubérculos para crescimento lento em vitroconservação de germoplasma de batata. **Planta Genet. Recurso News**, p.141-56.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. (1998) Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 509.
- HERMOSO, E. L. (2015) Padrão de distribuição espacial de *Vanilla phaeantha* Rchb.f. Hoehne (Orchidaceae) no Parque das Dunas, Salvador, Brasil. (**Trabalho de conclusão de curso**)
- HOEHNE, F. C. (1945) Orchidaceas. In: HOEHNE, F. C. (ed.) **Flora brasileira**, v. 12, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 1-389.
- HOEHNE, F. C. (1949) **Iconografia de orquídeas do Brasil**, S.A. Indústrias “Graphicars-f. Lanzara”, São Paulo, p. 601.
- HOLFORD, P. Ç.; NEWBURY, H. J. (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Anturrhinum manjus*. **Plant cell report**, v. 11, p. 93-96.
- HOMMA, A. K. O. (2012) Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia?. **Dossiê Sustentabilidade**, Estudos Avançados, v. 26, p. 167-186.
- HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A.; MATOS G. B. (2006) Cultivo de baunilha: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**.
- IUCN (2022) **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-2. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 31 de agosto de 2023.
- JALIGOT, E.; ADLER, S.; DEBLADIS, E.; BEULE, T.; RICHAUD, F.; ILBERT, P.; FINNEGAN, E. J.; RIVAL, A. (2011) Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 108, p.1453-1462.
- JIMÉNEZ-QUESADA, K.; SCHMIDT-DURÁN, A.; QUESADA-MONTERO, K., MOREIRA-GONZÁLEZ, I. (2014) Aislamiento de una bacteria endófito de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad biocontroladora *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. Vanillae. **Tecnología en Marcha**, v. 28, n. 2, p. 116-125.
- KAPAI, V. Y.; KAPOOR, P.; RAO, I. U. (2010) In vitro propagation for conservation of rare and threatened plants of India – A review. **International Journal of Biological Technology**, v. 1, n. 2, p. 1-14.
- KELLER, E. R. J.; SENULA, A.; HÖFER, M.; HEINE-DOBBERNACK, E.; SCHUMACHER, H. M.; (2013) Cryopreservation of plant cells. In: WILEY, J.; SONS **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Biopreparation, and Cell Technology**.

- KENDON, J. P.; RAJAOVELONA L.; SANDFORD H.; FANG R.; BELL J.; SARASAN, V. (2017) Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: 'in vitro collecting' as a case study. **Botanical Studies**, v. 58, n. 34, p. 1-14.
- KHOYRATTY, S.; KODJA, H.; VERPOORTE, R. (2018) Vanilla flavor production methods: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 433-442.
- LEE-ESPINOSA, H. E.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; GARCÍA-ROSAS, B.; CÓRDOVA-CONTRERAS, A. L.; LAGUNA-CERDA, A.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; BARAHONA-PÉREZ, L. F.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; SANTANA-BUZZY, N. (2008) Vitro Clonal Propagation of *Vanilla (Vanilla planifolia 'Andrews')*. **Hortscience**, v. 43, n. 2, p. 454-458.
- LEIFERT, C.; WAITES, W. M. (1994). Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (eds) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. **Springer**, p. 363-378.
- LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FIGUEIREDO, P. M.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. (2007) Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 672-674.
- LOZANO, R. M. A. (2014) Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de vainillas mexicanas. **Centro de Investigaciones Tropicales**, p. 100.
- MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. (2009) Efficient in vitro plant regeneration, flowering and fruiting dwarf tomato c.v. micro-msk. **Plant omics journal**, v. 2, p. 98-102.
- MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. (2010) Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Caracterização *in vitro*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Documento 318.
- MELNICK, R.; BAILEY, B.; BACKMAN, P. (2012) Bacterial Endophytes of Perennial Crops for Management of Plant Disease. In: MAHESHWARI, M.; SARAF, A.; AERON **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity**, Ahmedabad, India: Springer, p. 49-75.
- MENEZES, T. P.; GOMES, W. A.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. (2012) Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 868-876.

- MENGESHA, A.; AYENEW, B.; GEBREMARIAM, E.; TADESSE, T. (2012) Micropropagation of *Vanilla planifolia* using Enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) starch as a gelling agent. **Current Research Journal Biological Sciences**, v. 4, p. 519-25.
- MINOO, D.; JAYAKUMAR, V. N.; VEENA, S. S.; VIMALA, J.; BASHA, A.; SAJI, K. V.; BABU, K. N.; PETER, K. V. (2007) Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 459-470.
- MURASHIGE, T. (1974) Plant Propagation through Tissue Cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497.
- NASCIMENTO, T. A.; FURTADO, M. S. C.; PEREIRA, W. C.; BARBERENA, F. F. V. A. (2019) *Vanilla phaeantha* Rchb.f. Hoehne (Orchidaceae): studies on fruit development and new perspectives into crop improvement for the *Vanilla planifolia* group. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 3.
- NEGI, D.; SAXENA, S. (2011) Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 604-610.
- NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. (2010) Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas**, Viçosa, MG, Arca, p. 59-88.
- NOGUEIRA, J. S.; COSTA, F. H. S.; VALE, P. A. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2017) Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**, 1 ed, Rio de Janeiro: ICH, p. 103-129.
- NOGUEIRA, J. S. (2018) Estratégias para a conservação *ex situ* de *Dendrocalamus asper* e micropropagação de espécies do gênero *Guadua* (Bambusoideae, Poaceae). Brasília: Universidade de Brasília-UnB. **(Tese de doutorado)**.
- NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2019) Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49.



- OLIVEIRA, S. O. D.; SAYD, R. M.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2013) A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204-209.
- Orchidaceae in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>>. Acesso em: 31 de agosto de 2023.
- ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 128, p. 487-508.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. (1975) **Orchidaceae brasilienses**, Kurt Schmersow, Hildesheim, v. 1. p. 408.
- PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. (2008) A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. **Rodriguesia**, v. 59, p. 99-111.
- PATEL, B.; GAMI, B.; PATEL, N.; BARIA, V. (2015) One step pre-hardening micropropagation of *Bambusa balcoa* Roxb. **Journal of Phytology**, v. 7, p. 1-9.
- PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. (2007) Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**, Viçosa: UFV, cap. 4, p. 75-92.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. (2003) Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834.
- PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (1999) **Genera Orchidacearum: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae**, Oxford University Press, Oxford, v. 1.
- PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (2003) **Genera Orchidacearum: Orchidoideae (part 2) – Vanilloideae**, Oxford University Press, Oxford, v. 3.
- POWO (2023). Plants of the World Online. **Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>> Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MADDEGODA, K. M. M. N.; VITHARANA, M. C.; CHATURANI, G. D. C. (2008) Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. **Scientia Horticulturae**, v. 118, p. 270-273.

- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 2, p. 154-160.
- RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. (2014) Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 50, p. 576-581.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. (2003) Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122.
- RODRIGUES, P. H. V.; ARRUDA F.; FORTI, V. A. (2018) Slow-grown in vitro conservation of *Heliconia champneiana* cv. Splash under different light spectra. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 2, p. 163-166.
- ROSSIA, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; AYUB, M. A. Z. (2019) Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223-227.
- RUDALL, P. J.; BATEMAN, R. M. (2002) Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. **Biological Reviews Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 3, p. 403-441.
- SÁ, T. S. A. M. (2019) Micropropagação, embriogênese somática, conservação *in vitro* e duplicação cromossômica em *Cattleya tigrina* a. Rich. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe. (Tese de doutorado).
- SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. (2002) **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**, Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Agrária, p. 207.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; FORTES, G. R. L. (2003) Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1035-1043.
- SCHUCK, M. R.; LIPSKI, B.; SILVA, A. L. L.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. (2012) Acclimatization of micropropagated plants of fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) in different substrates. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 206-212.

- SILVA, M. D. D. (2005) Enraizamento de estacas da baunilha (*Vanilla planifolia* Andrews): ácido indolbutírico, recipientes, meio de enraizamento, tamanho e tipo de estaca. Lavras: UFLA, p. 155. (Tese de doutorado).
- SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. (2013) Evaluation of genetic fidelity of in vitro raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 419-430.
- SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D.; SALOMÃO, L. C. C.; SILVA, F. F.; BARROS, Z. J. (2013) Micropropagação de bananeira 'Maça', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 745-751.
- SOTO-ARENAS, M. A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. **Instituto Chinoin A. C. Bases de datos SNIB-CONABIO**, México.
- SOTO-ARENAS, M. A.; CRIBB, P. (2010) A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). **Lankesteriana**, v. 9, n. 3, p. 355-398.
- STERN, W. L.; JUDD, W. S. (1999) Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 131, n. 4, p. 353-382.
- TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S.; SANTOS, M. O. (2002) Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília.
- TEIXEIRA, J. B. (2006) Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, p. 27.
- THAKUR, S.; TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K. (2015) In vitro approaches for conservation of *Asparagus racemosus* Willd. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 51, p. 619-625.
- TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C. E. (1985) Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v. 5, p. 107-117.
- TREJGELL, A.; KAMINSKA, M.; TRETYN, A. (2015) In vitro slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 234.
- TREMBLAY, R. L. (1992) Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 3.
- UCHIDA, J. Y. (2011) Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Vanilla (*Vanilla planifolia*). **Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry**.

- VEIGA, R. F. A. (2006) A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agronômico (IAC). **O Agrônomo**, v. 58, n. 1, p. 19-21.
- VILLANUEVA-VIRAMONTES, S.; HERNÁNDEZ-APOLINAR, M.; FERNÁNDEZ-CONCHA, G.C.; DORANTES-EUÁN, A.; DZIB, G.R.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. (2017) Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. **Botanical Science**, v. 95, p. 169-187.
- YANG, J. L.; SEONG, E. S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU, C. Y.; LI, C. H. (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, n. 1, p. 49-58.
- YOUNG, P.; MURTHY, H.; YOEU, P. (2000) Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 67-72.
- YEASMIN, L.; ALI, M. N.; GANTAIT, S.; CHAKRABORTY, S. (2014) Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. **3 Biotech**.
- WANG, Q. M.; WANG, L. (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1535–1547.

## **CAPÍTULO I**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DE BAUNILHA (*Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews)**

## RESUMO

Baunilha é uma espécie de planta com flor pertencente à família das orquídeas (Orchidaceae). A micropropagação é uma importante ferramenta para a produção de plântulas, especialmente considerando que os métodos vegetativos convencionais são de baixa produtividade e caros, podendo comprometer as plantas doadoras de propágulos. O estudo foi conduzido com o objetivo de introduzir técnicas inovadoras de propagação *in vitro* para espécies de baunilha (*Vanilla planifolia* e *V. phaeantha*). O foco primário desta pesquisa foi avaliar a eficácia da técnica de dupla fase e a utilização de sistemas de biorreatores de imersão temporária na multiplicação clonal. Adicionalmente, o trabalho teve como objetivo identificar condições ótimas para a aclimatização das plântulas. Além disso, devido à forte contaminação bacteriana observada no início do estabelecimento *in vitro*, o estudo incluiu o isolamento, identificação e controle dessas bactérias ocorrentes na cultura. A fase inicial envolveu o estabelecimento *in vitro* de acessos, utilizando-se explantes obtidos de plantas-mãe em casa de vegetação. Para tratar a contaminação endofítica, os explantes passaram por um processo de descontaminação. Esse processo baseou-se na suplementação de Ampicilina Sódica ao meio de cultura em diferentes concentrações (0, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>) para até cinco subcultivos. As bactérias presentes na cultura durante a fase de estabelecimento foram isoladas e identificadas utilizando a sequência 16S rRNA. O estudo também englobou uma avaliação de estratégias de multiplicação clonal, que incluiu a avaliação da influência de diferentes consistências de meios de cultura (líquido, dupla-fase e semissólido) e o uso de três modelos de biorreatores de imersão temporária (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>). As plântulas resultantes foram aclimatizadas em mistura de substrato comercial e fibra de coco com composição variável e mantidas em câmara de crescimento antes de serem transferidas para casa de vegetação. Verificou-se que o uso de Ampicilina Sódica levou a uma redução significativa da contaminação bacteriana em cinco subculturas. O sequenciamento utilizando o gene 16S rRNA possibilitou a identificação de bactérias contaminantes, incluindo espécies dos gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum* e *Methylobacterium*. Ao avaliar a consistência do meio, o método de dupla fase emergiu como a alternativa superior para a multiplicação das espécies, produzindo um maior número de brotações por explante ( $7,0 \pm 0,4$ ) em relação ao meio semissólido ( $5,3 \pm 0,3$ ). Entre os modelos de biorreator de imersão temporária testados, o RALM<sup>®</sup> superou a RITA<sup>®</sup> e a BIT<sup>®</sup> em termos de número de brotos formados por explante ( $8,2 \pm 0,3$ ;  $4,9 \pm 0,2$  e  $1,2 \pm 0,1$ , respectivamente). A utilização de substratos compostos por substrato comercial e fibra de coco, em qualquer combinação testada, mostrou-se eficaz, garantindo 100% de sobrevivência das plântulas de baunilha em casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, biorreator, meio dupla-fase, limpeza clonal, micropropagação.

## ABSTRACT

Vanilla is a plant of the genus *Vanilla* belonging to Orchidaceae family. Micropropagation is an important tool for producing plantlets, especially considering that conventional vegetative methods are low-yielding and expensive, and it can compromise the donor plants of propagules. The study was conducted with the objective of introducing innovative in vitro propagation techniques for vanilla species (*Vanilla planifolia* and *V. phaeantha*). The primary focus of this research was to evaluate the effectiveness of the double-phase technique and the utilization of temporary immersion bioreactor systems on clonal multiplication. Additionally, the study aimed to identify optimal conditions for plantlets acclimatization. Moreover, due to the strong bacterial contamination observed at the beginning of the in vitro establishment, the study included the isolation, identification, and control of these bacteria occurring in the culture. The initial phase involved the in vitro establishment accessions, using explants obtained from mother plants in a greenhouse. To address endophytic contamination, the explants underwent a decontamination process. This process was based on the supplementation of Sodium Ampicillin to the culture medium at different concentrations (0, 250, and 500 mg L<sup>-1</sup>) for up to five subcultures. The bacteria present in the culture during the establishment phase were isolated and identified using the 16S rRNA sequence. The study also encompassed an evaluation of clonal multiplication strategies, which included assessing the influence of different consistencies of culture media (liquid, double-phase, and semisolid), and the use of three temporary immersion bioreactor models (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup>, and BIT<sup>®</sup>). The resulting plantlets underwent acclimatization in a mixture of commercial substrate and coconut fiber with varying composition and were kept in a growth chamber before being transferred to a greenhouse. It was verified that the use of Sodium Ampicillin led to a significant reduction in bacterial contamination over five subcultures. Sequencing using the 16S rRNA gene enabled the identification of contaminant bacteria, including species of the genera *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, and *Methylobacterium*. When evaluating the medium's consistency, the double-phase method emerged as the superior alternative for species multiplication, yielding a greater number of shoots per explant ( $7.0 \pm 0.4$ ) compared to the semisolid medium ( $5.3 \pm 0.3$ ). Among the tested temporary immersion bioreactor models, RALM<sup>®</sup> outperformed RITA<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> in terms of the number of shoots formed per explant ( $8.2 \pm 0.3$ ;  $4.9 \pm 0.2$ , and  $1.2 \pm 0.1$ , respectively). The use of substrates composed of commercial substrate and coconut fiber, in any combination tested, proved to be effective, ensuring 100% survival of vanilla plantlets in greenhouse.

**Keywords:** Orchidaceae, bioreactor, double-phase medium, clonal cleaning, micropropagation.

## 1 INTRODUÇÃO

A baunilha é uma planta do gênero *Vanilla*, pertencente à família Orchidaceae, o qual é composto por cerca de 121 espécies, algumas extintas e outras em situação de perigo por causa da destruição de seus habitats naturais e manejo inadequado, especialmente nas regiões tropicais das Américas, principalmente no México (DIVAKARAN; BABU; PETER, 2006; IUCN, 2022; POWO, 2023). Seu fruto é de grande importância econômica, visto que produz a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), composto orgânico muito utilizado na gastronomia, indústrias farmacêuticas, alimentícia, de cosméticos e tabacaria, com o objetivo de intensificar aromas e sabores (HOMMA *et al.*, 2006; LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013; FERRARA, 2019; BRAMEL; FREY, 2021).

Apesar do Brasil apresentar condições favoráveis para o cultivo da baunilha, a produção é baixa e dispendiosa com as técnicas de propagação convencionais. Normalmente, a baunilha é propagada por meio de estaquia, mas esse método é oneroso e poder gerar prejuízo à planta matriz, além de ser lento e, geralmente, não suprir a demanda comercial (GANTAIT; KUNDU, 2017). A micropropagação pode gerar uma produção em larga escala de mudas utilizando uma pequena quantidade de material, a partir de tecidos e órgãos de plantas matrizes, mantendo a identidade genética do material propagado (MENEZES *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2017). Para isso, algumas estratégias são estudadas e utilizadas, como o cultivo em biorreatores com sistema de imersão temporária (RAMOS-CASTELLÁ *et al.*, 2014; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016), e o cultivo em sistema de meio dupla-fase (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

As baunilhas, como a maioria das orquídeas, dependem de interações com microrganismos endofíticos, como fungos e bactérias, para seu desenvolvimento *ex vitro* (LOZANO, 2014). Enquanto esses microrganismos dificultam o cultivo *in vitro*, no campo, eles ajudam a planta de diversas formas, podendo diminuir casos de herbivoria, melhorar o crescimento, desencadear uma cascata de defesa contra certas doenças, entre outras (MELNICK *et al.*, 2012). Para eliminar esses microrganismos da cultura *in vitro*, já que eles competem pelos nutrientes do meio liberando compostos tóxicos, são utilizados antibióticos de amplo espectro como, por exemplo, ampicilina, eritromicina e cloranfenicol (HOLFORD; NEWBURY, 1992; MAMIDALA; NANNA, 2009). A identificação das bactérias endofíticas que acometem as espécies de baunilhas pode ajudar a melhorar o protocolo de combate à contaminação na cultura *in vitro*, evitando resistência a antibióticos, e ajudar no melhoramento do cultivo *ex vitro* de baunilhas.



Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo identificar as bactérias endofíticas que convivem com as espécies de baunilhas estudadas (*Vanilla phaeantha* e *Vanilla planifolia*), melhorar o protocolo de estabelecimento e micropropagação, bem como desenvolver protocolos e técnicas para produção em larga escala de baunilha, livre patógenos e de boa qualidade genética.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Conservação *In vitro* e no Laboratório de Cultura de Tecidos II, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

### 2.1 Estabelecimento *in vitro* de baunilha

#### 2.1.1 Planta matriz

O material vegetal utilizado foi coletado de dois acessos, LBB e DBS647, de plantas matrizes de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., mantidas no telado de baunilhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ambos os acessos foram coletados em área de Cerrado, sendo o acesso LBB coletado na cidade de Brasília, Distrito Federal, e o acesso DBS647 coletado na região de Unai, Minas Gerais.

#### 2.1.2 Desinfestação e inoculação em meio de cultura para estabelecimento *in vitro*

As estacas foram coletadas e foram submetidas à uma pré-lavagem em água corrente e detergente neutro para eliminação de impurezas visíveis, como substrato e insetos. Após a pré-lavagem, as estacas foram seccionadas em porções caulinares (nodais) de aproximadamente 1,0 cm de altura, com pelo menos uma gema axilar.

Os segmentos nodais passaram por um processo de desinfestação, sendo manipulados em câmara de fluxo laminar, a partir da imersão em etanol 70% durante 5 minutos. Em seguida, eles foram mergulhados por 25 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 5% de cloro ativo. Por fim, os explantes foram lavados por três vezes, durante 5 minutos cada, em água destilada e autoclavada.

Uma vez desinfestados, os explantes foram transferidos para meio de cultura de Murashige e Skoog (MS, 1962), complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (agente gelificante). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C.

As condições do cultivo dos explantes foram de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Nessa fase, os explantes foram mantidos por 30 dias e analisados (em termos percentuais) quanto à contaminação fúngica e bacteriana nos períodos de 7, 15 e 30 dias de cultivo. Foram avaliadas 24 repetições do acesso LBB (*Vanilla phaeantha*) e 14 do acesso DBS647 (*Vanilla phaeantha*), sendo cada repetição

constituída por um tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 ml de meio e uma brotação por tubo.

### 2.1.3 Teste de fitotoxicidade da Ampicilina Sódica em baunilha

O teste de fitotoxicidade foi realizado com o antibiótico de amplo espectro – Ampicilina Sódica (Sigma, A0166-5G). Para tal, foi realizada a inoculação dos explantes em meio de cultura de MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, além de três concentrações de ampicilina: 0 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup> e 500 mg L<sup>-1</sup> (introduzida ao meio de cultura por esterilização à frio). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C. As condições do cultivo dos explantes foram de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Os explantes foram mantidos por 30 dias e analisados quanto à contaminação bacteriana (em termos percentuais) nos períodos de 7, 15 e 30 dias de cultivo. Adicionalmente, foram realizadas análises quanto ao desenvolvimento e as avaliações foram baseadas na média aritmética de cada variante – presença de raiz, presença de brotação nova e oxidação (escurecimento) do explante. No total, foram avaliadas 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 ml de meio e uma brotação por tubo.

### 2.1.4 Limpeza de microrganismos endofíticos em baunilha com o auxílio da Ampicilina Sódica

Os explantes oriundos da fase de estabelecimento *in vitro*, que apresentaram contaminação bacteriana e desenvolvimento, passaram por um processo de descontaminação, com auxílio da Ampicilina Sódica.

Foram realizados até 5 subcultivos sucessivos de 30 dias cada, em meio de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel e 500 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina (concentração que apresentou o melhor resultado de acordo com o teste de fitotoxicidade supracitado), além de um sexto subcultivo em meio de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, sem ampicilina. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C. As condições do cultivo dos explantes foram de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A cada subcultivo, foram retiradas das hastes amostras caracterizadas por discos de 1 a 3 mm de diâmetro, os quais foram inoculados em meio Ágar Nutriente (AN), em placas de Petri (90 x 15 mm) com 20 ml de meio por placa, para desenvolvimento de bactérias. As análises, visual e em AN (em termos percentuais), de descontaminação dos explantes foram realizadas nos intervalos de 7, 15 e 30 dias de cada cultivo.

Após alguns meses do último subcultivo, em meio livre de antibiótico, amostras formadas por discos das regiões basal, medial e apical de brotações dos dois acessos de *V. phaeantha* (LBB e DBS647) foram coletadas para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram fixadas em Karnovsky (JOHANSEN, 1940) por 24 h, enxaguadas em tampão de cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,1) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% e tampão cacodilato de sódio por 03 horas. Em seguida, foram lavadas três vezes em mesmo tampão de fixação, desidratadas em série etanólica crescente (25 a 100%), submetidas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> e metalizadas com ouro-paládio. As observações e captura de imagem foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 962.

Além das análises quanto à contaminação, análises quanto ao desenvolvimento foram realizadas e as avaliações foram feitas baseadas na média aritmética das alturas dos brotos. Nesse experimento, cada repetição foi formada por um tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 ml de meio e uma brotação por tubo. A taxa de multiplicação foi calculada pela média aritmética do número de gemas formadas a partir das gemas do subcultivo anterior. E a taxa de multiplicação acumulada foi calculada pelo número de novas brotações em cada subcultivo.

## 2.2 Identificação de bactérias endofíticas em *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

Os experimentos de identificação de bactérias endofíticas foram realizados em parceria com o Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para identificação das bactérias endofíticas presentes nos explantes de *Vanilla phaeantha* foram retiradas amostras das colônias desenvolvidas no meio de cultura utilizado para o estabelecimento *in vitro* da espécie.

Amostras foram colocadas para crescer em meio nutritivo Kado e Heskett (KH, 1970), à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, colônias isoladas foram inoculadas separadamente em meio novo para purificação. Então, cada bactéria foi repicada em meio novo e colocadas para crescer à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 48 horas, onde amostras foram coletadas e

armazenadas em *eppendorf* de 1,5 mL, contendo água destilada e autoclavada, no refrigerador, para utilização futura.

Adicionalmente, realizou-se um Teste de Reação Gram, com objetivo de diferenciar bactérias gram-positivas e gram-negativas. Para o teste, as amostras armazenadas em refrigerador, em água destilada autoclavada, foram colocadas para crescer em meio KH à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 48 horas. Após esse período, amostras de cada bactéria foram colocadas em lâminas de vidro com 2 a 3 gotas de hidróxido de potássio (KOH) a 3%, o que culminou na formação de uma mistura líquida (bactéria gram-positiva) ou viscosa em ponto de fio (bactéria gram-negativa).

Também foi realizada a extração do DNA bacteriano das amostras para posterior sequenciamento genético e identificação dos gêneros das bactérias endofíticas encontradas na espécie de baunilha estudada. Para extração do DNA bacteriano, amostras armazenadas em água destilada autoclavada foram colocadas para crescer em meio KH à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 a 48 horas. Após a bactéria tapetar a placa com o meio, a colônia foi coletada da placa e colocada em *eppendorf* de 1,5 mL contendo 200  $\mu\text{L}$  de tampão de extração 1x (Tris-EDTA), 4  $\mu\text{L}$  de lisosima ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e 5 esferas de vidro. Os *eppendorf* foram dispostos sobre mesa agitadora (GyroMini Nutating Mixer, Labnet) por 2 a 3 horas, até que a consistência da mistura exibisse consistência líquida.

Após o período em mesa agitadora, foram adicionados à mistura 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lise e 4  $\mu\text{L}$  de proteinase K. A mistura foi agitada em Vortex Mixer (Labnet) e aquecida em banho maria à  $60^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, quando então receberam 500  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado. O sobrenadante foi pipetado e colocado em um *eppendorf* novo, completado para 1000  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado, o qual foi levado para centrífuga (Hermle Z326K, Labortechnik GmbH) à 12000 rotações por minuto, por 5 minutos. Após a formação do *pellet*, o etanol foi descartado e a amostra colocada para secar à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas duas lavagens com etanol 70% gelado, em centrífuga à 12000 rotações por minuto, por 5 minutos cada. Logo após, o etanol foi descartado e as amostras colocadas para secar à temperatura ambiente. Após as duas lavagens, foram adicionados ao *pellet* 150  $\mu\text{L}$  de tampão de extração 0,1x (Tris-EDTA) e 2  $\mu\text{L}$  de RNase. As amostras foram aquecidas em banho maria, à  $37^\circ\text{C}$ , por 15 minutos e, posteriormente, levadas ao refrigerador até o dia seguinte para quantificação do DNA extraído.

Para quantificação do DNA extraído, em um *eppendorf* de 500  $\mu\text{L}$  foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de QuantiFlour ONE dsDNA Dye e 2  $\mu\text{L}$  da amostra do DNA

bacteriano. Em seguida, as amostras foram inseridas no fluorômetro (Quantus Fluorometer, Promega), configurado para o volume de 2  $\mu\text{L}$  e unidade de medida em  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água livre de nuclease (Nuclease-Free Water) para o volume final de 20  $\mu\text{L}$ , com concentração final de  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA bacteriano.

Para a reação em cadeia pela polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foi feita uma solução composta por 20,2  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease (Nuclease-Free Water), 3  $\mu\text{L}$  de tampão 10x (Tris-HCL), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados), 0,5  $\mu\text{L}$  do *primer* fD1 – 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (WEISBURG *et al.*, 1991), 0,5  $\mu\text{L}$  do *primer* rD1 – 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (WEISBURG *et al.*, 1991), 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase, e 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA diluído. De acordo com Weisburg *et al.* (1991), a sequência (*primer*) 16S rRNAs é uma ferramenta importante na comparação de sequências de rRNA para determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre bactérias, arqueobactérias e organismos eucarióticos.

Após o preparo da solução, as amostras foram levadas para o termociclador (Applied Biosystems, Veriti 96-Well Programmable Thermocycler) com programação feita de acordo com Weisburg *et al.* (1991). O produto da PCR foi submetido à eletroforese, em gel de agarose, para avaliar amplificação do DNA bacteriano extraído. Após a confirmação de amplificação, as amostras foram submetidas ao processo de purificação. Foram adicionados 12  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio (NaCl) e 500  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado às amostras, as quais foram mantidas em freezer por pelo menos uma noite. No dia seguinte, as amostras foram levadas para centrífuga, à 10000 rotações por minuto, por 5 minutos. Posteriormente, o etanol foi descartado e foram realizadas duas lavagens em 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado, em centrífuga, à 10000 rotações por minuto, por 5 minutos cada. Ao final das lavagens, o etanol foi descartado e as amostras colocadas para secar em temperatura ambiente. Posteriormente, foram enviadas para a Macrogen, Inc., empresa de biotecnologia, para sequenciamento genético.

As sequências genéticas foram inseridas no Geneious Prime, software para análise de dados moleculares e de sequência genéticas, e pareadas com sequências previamente identificadas, disponíveis no GenBank, banco de dados de sequências de nucleotídeos mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCIB).

## 2.3 Multiplicação *in vitro* de espécies de baunilha

### 2.3.1 Efeito de diferentes consistências do meio de cultivo (semissólida, dupla-fase e líquida) na multiplicação *in vitro* de baunilha

Esse teste foi baseado nos protocolos desenvolvidos por Oliveira *et al.* (2013), com adaptações. Para o teste de tipos de meio, foram utilizados explantes (porções caulinares nodais de aproximadamente 1,0 cm de altura, com pelo menos uma gema) de acessos de duas espécies de baunilha – *Vanilla planifolia* e *Vanilla phaeantha*, ambas disponíveis na Coleção de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Foi utilizado o meio básico de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,3 g L<sup>-1</sup> e 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP), para o meio líquido e fase líquida do dupla-fase. Para o meio semissólido e fase semissólida do dupla-fase foram utilizadas 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C. As condições do cultivo dos explantes foram de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

O experimento foi montado em frascos de vidro (65 x 110 mm) contendo 30 ml de meio para o meio semissólido e líquido. Para o meio dupla-fase, foram colocados 20 ml de meio semissólido mais 10 ml de meio líquido, sendo o meio líquido colocado sobre o meio semissólido. A cada 30 dias, realizou-se a manutenção dos tratamentos, onde o tratamento caracterizado pelo meio semissólido foi mantido intacto, o dupla-fase recebeu mais 10 ml de meio líquido, e, para o líquido foi realizada uma renovação parcial de 15 ml do meio. Cada tratamento foi constituído por 5 repetições de cada acesso, sendo três frascos de vidro (65 x 110 mm) por repetição, com cinco explantes por frasco. Os tratamentos foram analisados mensalmente, quanto ao número de novos brotos por explante.

Após 90 dias de cultivo, para regeneração, as brotações formadas no meio dupla-fase e semissólido, foram separadas e colocadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio básico de MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel. Cada tratamento foi constituído por 5 repetições de cada acesso, sendo cinco tubos de ensaio (25 x 150 mm) por repetição, com uma brotação por tubo. A análise da regeneração foi realizada a cada 30 dias, por 60 dias, sendo avaliados as variáveis altura do broto e a formação de raiz.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{x + 0,5}$  para dados numéricos, e  $\arcsen\sqrt{x \div 100}$  para dados de percentagem.

### 2.3.2 Efeito do uso de diferentes modelos de recipientes de cultivo na multiplicação de baunilha

Para o teste, foram utilizados explantes do acesso LBB de *Vanilla phaeantha*, caracterizados por porções caulinares (nodais) de aproximadamente 1,0 cm de altura, contendo pelo menos uma gema. Foram utilizados tubo de ensaio (25 x 150 mm) e três modelos de frascos de vidro de diferentes tamanhos: pequeno (65 x 75 mm, 120 mL), médio (65 x 110 mm, 250 mL) e grande (85 x 140 mm, 550 mL).

Foi utilizado o meio básico de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel. O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C. As condições do cultivo dos explantes foram de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O experimento foi montado em proporcionalidade e com 10 repetições. Cada repetição foi formada por um tubo de ensaio com 10 ml de meio e um explante, um frasco pequeno com 20 ml de meio e dois explantes, um frasco médio com 40 ml de meio e quatro explantes, e um frasco grande com 80 ml de meio e oito explantes. As análises foram feitas a cada 30 dias com base no desenvolvimento dos explantes, avaliando-se as seguintes variantes: altura do broto novo, número de gemas e número de raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{x + 0,5}$  para dados numéricos, e  $\arcsen\sqrt{x \div 100}$  para dados de percentagem.



### 2.3.3 Multiplicação de brotações de baunilha em diferentes modelos de biorreatores

Para este experimento, foram testados três modelos diferentes de biorreatores de imersão temporária, RITA<sup>®</sup> (1 L), RALM<sup>®</sup> (5 L) e BIT<sup>®</sup> (5 L), sobre a multiplicação *in vitro* de brotações do acesso LBB de *Vanilla phaeantha*.

Foram utilizados explantes de porções caulinares (nodais) de aproximadamente 1,0 cm de altura, com uma gema axilar, o meio utilizado foi o básico de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP). Para o modelo RITA<sup>®</sup>, foram utilizados 180 mL de meio líquido para 6 explantes. Já para os modelos RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>, foram utilizados 750 mL de meio líquido para 25 explantes, para cada modelo. Assim, foi mantida a proporcionalidade nutricional de 30 mL de meio de cultura para cada explante. Além dos modelos de biorreatores de imersão temporária, explantes foram cultivados em frascos contendo meio semissólido de mesma formulação, acrescido de agente gelificante – Phytigel (2,3 g L<sup>-1</sup>). Para o frasco, foram utilizados 90 mL de meio semissólido para 3 explantes.

O experimento foi formado por 9 repetições do frasco, 18 repetições do modelo RITA<sup>®</sup>, 75 repetições dos modelos RALM<sup>®</sup> e 75 repetições do modelo BIT<sup>®</sup>. A desproporcionalidade se deu porque cada repetição é representada por um explante e o tamanho de cada recipiente é variável. Para corrigi-la, as condições de cultivo foram todas padronizadas, sendo 30 mL de meio de cultura por explante, temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após 90 dias de cultivo, avaliou-se o número de novas brotações formadas por explante.

Após 90 dias de cultivo, para regeneração, as brotações formadas foram separadas e inoculadas em meio básico de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel. Cada tratamento foi constituído por 30 repetições. A análise da regeneração foi realizada após 30 dias de cultivo, sendo avaliadas a taxa de sobrevivência das brotações, altura dos brotos e presença de raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{(x+0,5)}$  para dados numéricos, e arco-seno $\sqrt{(x\div 100)}$  para dados de percentagem.

#### 2.4 Enraizamento e aclimatização de plantas de baunilha

Para o enraizamento dos explantes, eles foram transferidos para meio de MS, complementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel. Não foi necessária a utilização de reguladores de crescimento para os acessos das espécies estudadas, devido a ocorrência do enraizamento em meio básico.

Na aclimatização, foram testadas variadas combinações de substratos em diferentes concentrações, para o acesso LBB de *Vanilla phaeantha*. As plantas desenvolvidas *in vitro*, com alturas da parte aérea variando entre 5 cm e 15 cm, foram plantadas em copos plásticos de 300 mL (10 x 7,5 cm), previamente furados na parte inferior, para devida drenagem de água. Tais copos foram preenchidos com 150 mL de substrato, umidificados com aproximadamente 50 mL de água. Posteriormente, o material vegetal foi mantido em *Refrigerated Biological Incubator* (Percival I-35LLVL, Boone, Iowa), câmara de crescimento BOD, à 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por 30 dias.

Cada tratamento foi composto por 10 repetições. Os tratamentos (T) foram constituídos por substrato comercial (SC) e fibra de coco (FC) combinados entre si, conforme a seguir: T1 - 150 mL de SC, T2 - 150 mL de FC, T3 - 75 mL de SC mais 75 mL de FC, T4 - 100 mL de SC mais 50 mL de FC, T5 - 112,5 mL de SC mais 37,5 mL de FC, T6 - 50 mL de SC mais 100 mL de FC, T7 - 37,5 mL de SC mais 112,5 mL de FC.

A exposição das mudas às condições naturais foi conduzida de forma gradual. Nos primeiros 15 dias, após o plantio, as mudas foram mantidas isoladas por meio de copo plástico cobrindo a parte área, evitando trocas gasosas com o ambiente externo. Após 21 dias, o copo foi perfurado, permitindo a ocorrência de trocas gasosas. Com 30 dias, o copo foi retirado, expondo as mudas às condições naturais. Em seguida, elas foram encaminhadas para casa de vegetação. Após 30 dias em casa de vegetação, foram avaliadas a sobrevivência e altura das mudas.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{x + 0,5}$  para dados numéricos, e  $\arcsen\sqrt{x \div 100}$  para dados de percentagem.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estabelecimento *in vitro* de baunilha

O estabelecimento inicial das microestacas foi realizado com dois acessos de *Vanilla phaeantha* – LBB e DBS647, em meio de cultura básico. Ambos apresentaram uma alta taxa de contaminação (Figura 1), com 100% de contaminação bacteriana já na primeira semana de cultivo do acesso LBB. Além da contaminação bacteriana, também foi observada contaminação fúngica nos explantes, como pode ser visualizada na Tabela 1.



**Figura 1.** Contaminação durante o estabelecimento *in vitro* de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb.f.). A – Contaminação bacteriana em diferentes estágios. B – Contaminação bacteriana. C – Contaminação bacteriana e fúngica. Estrela: contaminação por fungo. Ponto: contaminação por bactéria. Escala: A – 2,5 cm. B e C – 1 cm.

**Tabela 1.** Percentual de contaminação fúngica e bacteriana durante o estabelecimento *in vitro* dos acessos LBB e DBS647 de *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

Tempo de cultivo (dias)	Contaminação (%)			
	Fúngica (%)		Bacteriana (%)	
	LBB	DBS647	LBB	DBS647
7	12,5	7,1	100,0	78,6
15	29,2	21,4	100,0	85,7
30	33,3	28,6	100,0	85,7

### 3.1.1 Teste de fitotoxicidade da Ampicilina Sódica em baunilha

No teste de fitotoxicidade foram analisadas as porcentagens de contaminação bacteriana e fúngica e o desenvolvimento do explante em meio de cultivo suplementado com diferentes concentrações do antibiótico Ampicilina Sódica.

O tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup> de Ampicilina) apresentou 100% de contaminação bacteriana nos primeiros 7 dias de cultivo, além de fúngica, o que já era esperado, mediante os dados obtidos durante a fase de estabelecimento *in vitro* (tópico anterior). Os tratamentos com Ampicilina (250 mg L<sup>-1</sup> e 500 mg L<sup>-1</sup>), por sua vez, proporcionaram menores taxas de contaminação tanto bacteriana quanto fúngica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentual de contaminação fúngica e bacteriana via teste de fitotoxicidade de explantes de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. com Ampicilina Sódica.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Contaminação (%)	
	Fúngica (%)	Bacteriana (%)
0	80,0	100,0
250	60,0	90,0
500	40,0	50,0

De maneira geral, a Ampicilina não afetou o desenvolvimento dos explantes. Explantes no tratamento controle (0 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram baixo desenvolvimento, em razão da alta taxa de contaminação observada. Já nos tratamentos onde o meio de cultura foi suplementado com 250 mg L<sup>-1</sup> e 500 mg L<sup>-1</sup> de Ampicilina, verificaram-se os melhores resultados de desenvolvimento dos explantes (Tabela 3).

Na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup>, verificou-se 40% de desenvolvimento, com explantes apresentando tanto raízes como brotos jovens. A concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> também se mostrou eficiente no desenvolvimento dos explantes, inclusive apresentando valores levemente superiores, com relação à formação de brotos quando comparados àqueles obtidos no tratamento com 250 mg L<sup>-1</sup>. Ademais, proporcionou baixa taxa de oxidação dos explantes (Tabela 3). Em função desses resultados, esse tratamento foi o

escolhido para iniciar o processo de limpeza dos explantes estabelecidos e contaminados por bactérias.

A Ampicilina Sódica é um antibiótico de amplo espectro do grupo das Aminopenicilinas, utilizado no combate de, principalmente, bactérias gram-negativas. Esse antibiótico tem sido utilizado na limpeza clonal *in vitro* de outras espécies vegetais, tais como *Musa sapientum* L. (HABIBA *et al.*, 2002), *Fraxinus* spp. (DONNARUMMA *et al.*, 2011), *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (JENA; SAMAL, 2011), e *Musa × paradisiaca* L. (EL-BANNA *et al.*, 2021).

**Tabela 3.** Percentual de desenvolvimento de explantes de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. submetidos ao teste de fitotoxicidade com Ampicilina Sódica.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Desenvolvimento (%)		
	Raiz (%)	Broto (%)	Oxidação (%)
0	10,0	0,0	0,0
250	40,0	40,0	10,0
500	40,0	50,0	0,0

Pelo fato de fungos apresentarem alta taxa de dispersão e colonização, explantes que apresentam contaminação fúngica foram descartados para evitar contaminações futuras de outros materiais. Dessa forma, apenas materiais contaminados com bactérias passaram para fase de limpeza com antibiótico.

### 3.1.2 Limpeza de microrganismos endofíticos em baunilha com o auxílio da Ampicilina Sódica

O processo de limpeza foi realizado com explantes dos dois acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e o DBS647 contaminados com bactérias oriundas da fase de estabelecimento *in vitro*.

No processo de limpeza, foram realizados cinco subcultivos, de 30 dias cada, em meio de cultura suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> de Ampicilina e um subcultivo final em meio de cultura básico desprovido de antibiótico. A cada final do período de cultivo, porções caulinares dos explantes foram avaliadas em placas contendo meio Ágar Nutriente visando identificar o crescimento bacteriano.

Ao final do quinto subcultivo, a análise visual da presença de contaminação revelou 0,7% de contaminação por bactéria para o acesso LBB, e 6,9% de contaminação bacteriana para o acesso DBS647 (Tabela 4). Já a análise dos explantes, cultivados em Ágar Nutriente

(AN), revelou 0% de contaminação para o acesso LBB, na primeira semana, mantendo-se nas seguintes, e 6,9%, ao final do período, para o acesso DBS647 (Tabela 4). Esses dados revelam a baixa eficiência da avaliação visual para contaminação bacteriana, para espécies de baunilhas. A espécie estudada, libera exsudados no meio de cultura que podem ser confundidos com contaminação bacteriana, e vice-versa.

Após permanência dos explantes por 30 dias em meio desprovido de antibiótico, verificou-se que o acesso LBB apresentou 0,1% de contaminação bacteriana visual e o acesso DBS647 3,0%. Em Ágar Nutriente, o acesso LBB apresentou 0% de contaminação e o acesso DBS647 2% (Tabela 4).

**Tabela 4.** Percentual de contaminação bacteriana (visual e em Ágar Nutriente) em acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647, em cinco subcultivos com 500 mg L<sup>-1</sup> de Ampicilina Sódica adicionado ao meio de cultura

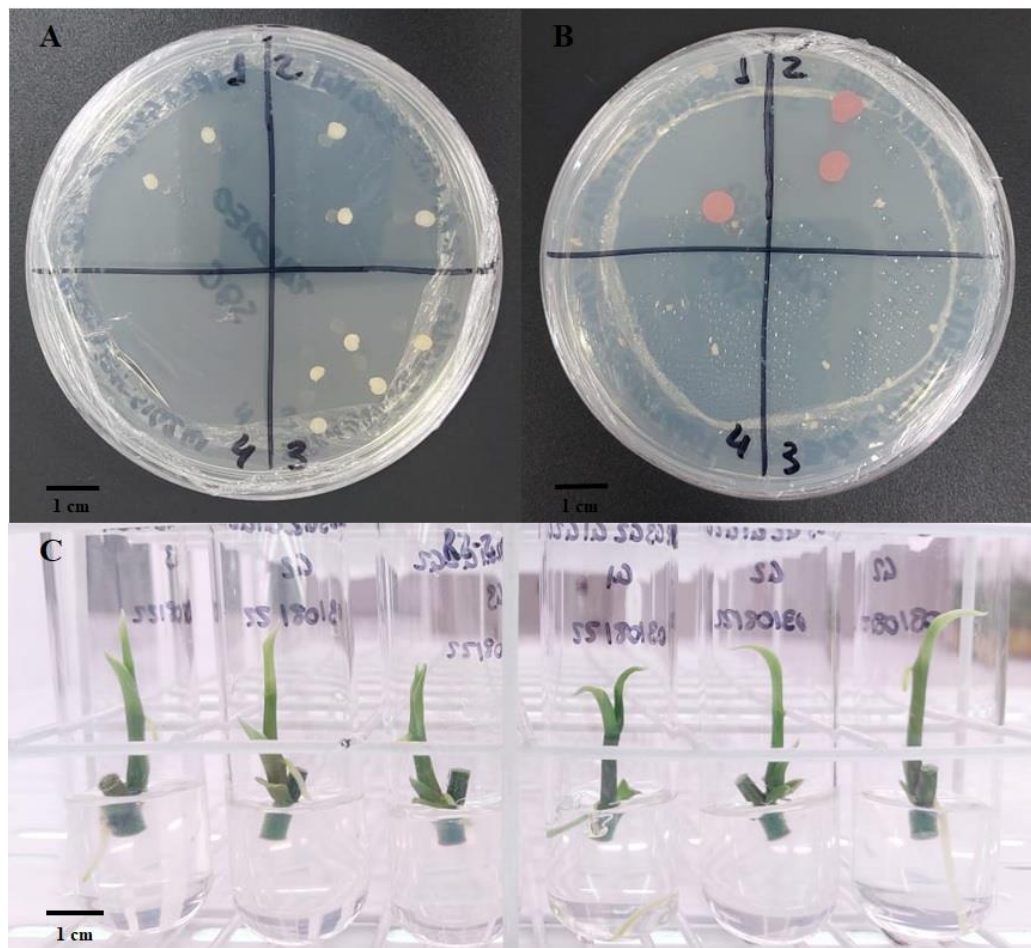
Tempo de cultivo (dias)	Contaminação bacteriana (%)																							
	Visual (%)												Ágar Nutriente (%)											
	1*		2		3		4		5		Final**		1		2		3		4		5		Final	
	L***	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
7	9,1	5,9	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	0,7	1,0	0,1	2,5	9,1	25,0	8,3	6,3	4,2	3,6	1,4	8,1	0,0	6,9	0,0	2,0
15	27,3	5,9	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	0,7	2,0	0,1	3,0	9,1	25,0	8,3	6,3	4,2	3,6	1,4	8,1	0,0	6,9	0,0	2,0
30	45,5	5,9	8,3	0,0	0,0	8,1	0,0	6,9	0,7	6,9	0,1	3,0	9,1	25,0	8,3	6,3	4,2	3,6	1,4	8,1	0,0	6,9	0,0	2,0

\*Subcultivo

\*\*Final: subcultivo final realizado em meio sem antibiótico.

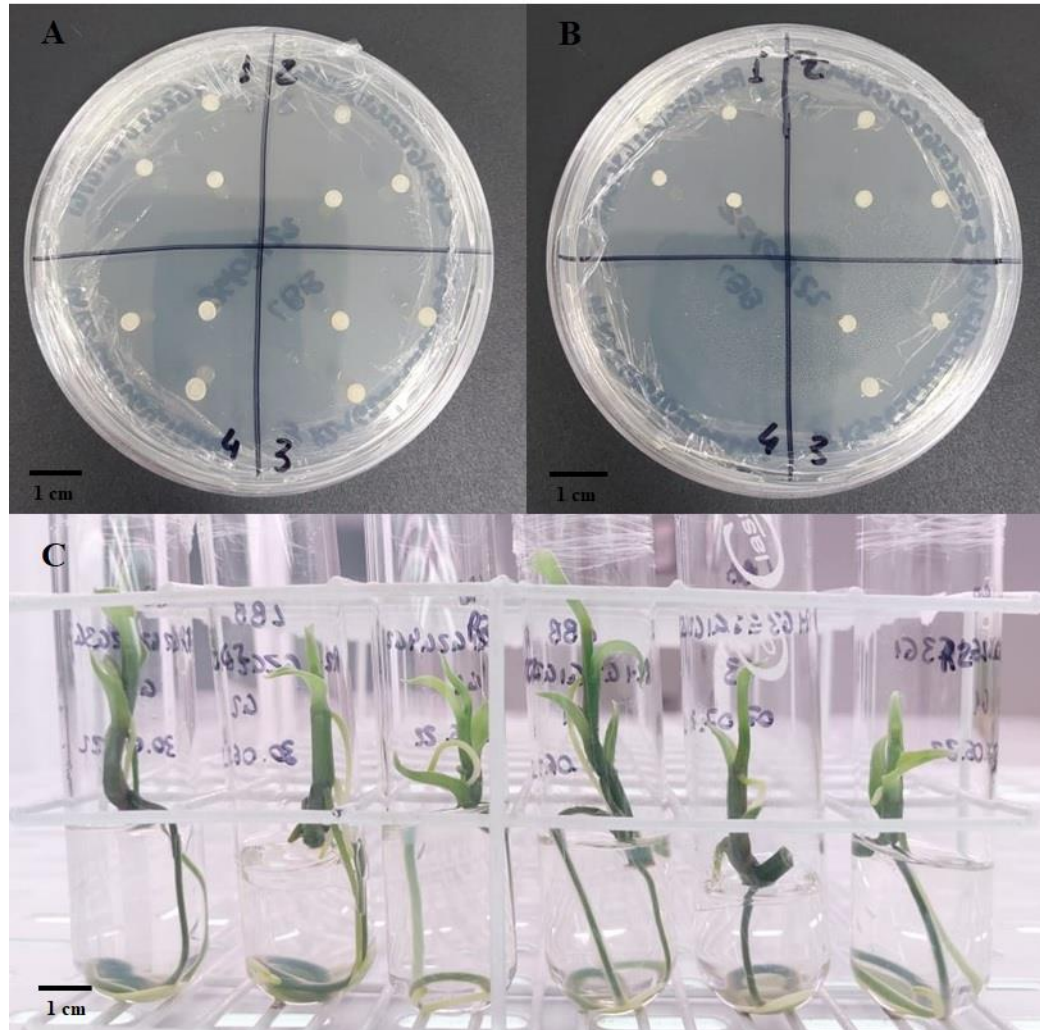
\*\*\*L - acesso LBB; D - acesso DBS647.

Os resultados das análises visual e em AN sugerem que alguns explantes ainda apresentavam contaminação endógena para o acesso DBS647 (Figura 2B), mas em quantidade menor quando comparada ao estabelecimento inicial (Tabela 1). Já com relação ao acesso LBB, constatou-se a limpeza total de bactérias endofíticas, após cinco subcultivos em Ampicilina Sódica (Figura 3).



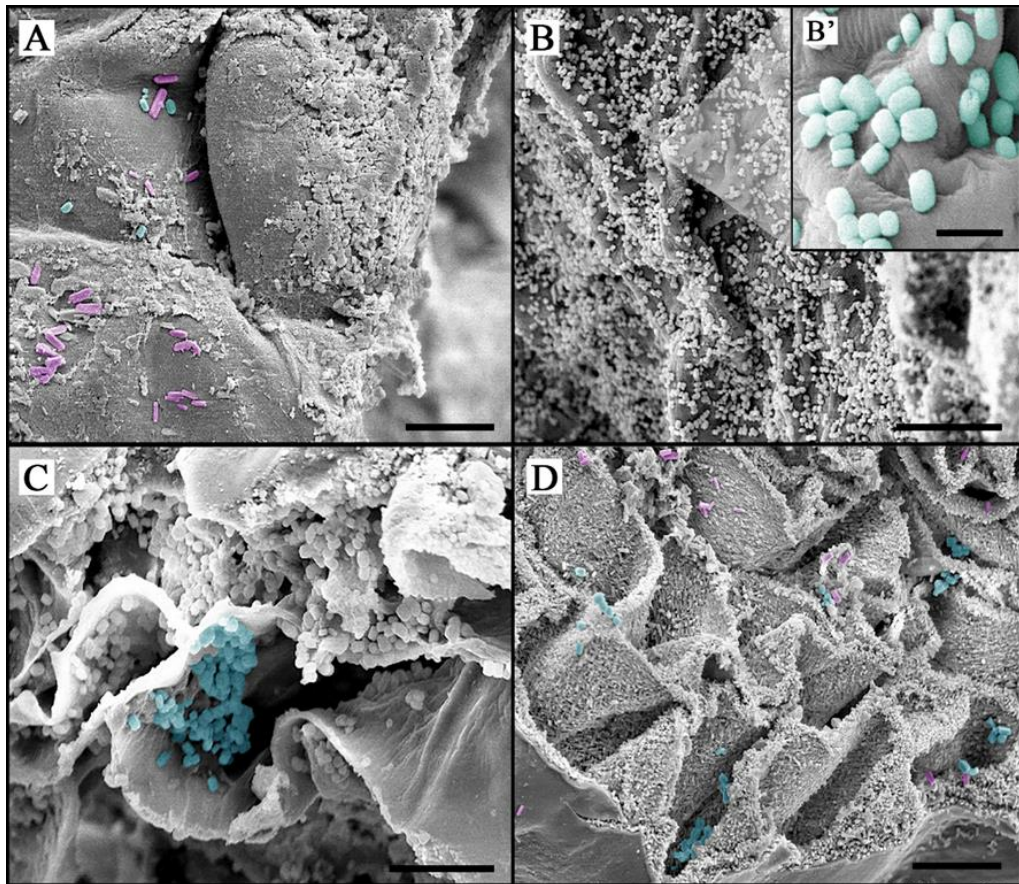
**Figura 2.** Aspecto dos cultivos no sexto subcultivo, durante o processo de limpeza de bactérias endofíticas, do acesso DBS647 de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., com Ampicilina Sódica. A – Ágar Nutriente sem contaminação bacteriana para quatro amostras. B – Ágar Nutriente apresentando contaminação bacteriana em duas amostras de quatro. C – Amostras de brotos jovens, cultivados em meio básico sem antibiótico, desprovidos de contaminação bacteriana. Escala: A, B e C – 1,0 cm.





**Figura 3.** Aspecto dos cultivos no sexto subcultivo, durante o processo de limpeza de bactérias endofíticas, do acesso LBB de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., com Ampicilina Sódica. A e B – Ágar Nutriente sem contaminação bacteriana para oito amostras. C – Amostras de brotos jovens, cultivados em meio básico sem antibiótico, desprovidos de contaminação bacteriana. Escala: A, B e C – 1 cm.

Quando as imagens geradas na microscopia de varredura são analisadas, elas confirmam que o acesso DBS647 realmente ainda apresenta uma elevada taxa de contaminação por bactérias endofíticas por toda extensão do caule da planta (Figura 4). Em contrapartida, mostram que o acesso LBB não está totalmente livre de bactérias endofíticas, porém apresenta uma carga de contaminantes menor do que a inicial, localizada principalmente na região mais basal do caule da planta (Figura 4).



**Figura 4.** Cortes transversais do caule de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. cultivada *in vitro* com bactérias endofíticas intracelulares e epifíticas visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A. Parte externa do caule com bactérias com diferentes formatos (algumas destacadas em cores diferentes). B. Parte externa do caule com bactérias. C. Secção caulinar com bactérias endofíticas intracelulares. D. Secção caulinar com menor densidade bacteriana. Escalas: A, B, D: 20  $\mu\text{M}$ , C: 10  $\mu\text{M}$ , B': 2,5  $\mu\text{M}$ . Magnificações: A, B, D: 1000 x, B': 5000 x, C: 2000 x.

Os antibióticos vêm sendo utilizados para prevenir ou bloquear o crescimento de bactérias em plantas cultivadas *in vitro*. Porém seu uso apresenta limitações, como alto custo, baixa eficácia contra determinados tipos de bactérias, termossensibilidade, fitotoxicidade e ineficácia contra fungos (ARAB *et al.*, 2014, SPINOSO-CASTILLO *et al.*, 2017). A não erradicação total de bactérias endofíticas pode se dar pelo fato da Ampicilina Sódica não ser totalmente eficaz contra determinada bactéria que os acessos apresentaram, corroborando com as limitações citadas pelos autores. Por isso a importância de estudos para identificação dessas bactérias endofíticas para uso mais direcionado de substâncias ativas e bactericidas. Segundo Cassells (2011) existem dois conceitos importantes quando

se refere a culturas livres de patógenos: axênico, em que a cultura é totalmente livre de qualquer contaminação biológica, e asséptico, em que a cultura é livre de contaminação detectável. Assim, outra hipótese é que não há cultivo *in vitro* totalmente livre de patógenos (axênico), como acredita-se, e sim cultivo asséptico. Microrganismos endofíticos podem se manter latentes no sistema e voltar a se desenvolver a qualquer desequilíbrio que acometa o sistema, favorecendo o patógeno, como, por exemplo, mudança do potencial osmótico ou composição hormonal do meio de cultura (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; CASSELLS, 2011). De acordo com Quambusch e Winkelmann (2018), pode ser mais promissor manter o equilíbrio da comunidade microbiana na cultura de tecidos do que a erradicação das bactérias endofíticas.

### 3.1.3 Taxa de multiplicação clonal acumulada *in vitro* de baunilha no período de limpeza bacteriana

Durante os seis subcultivos, além das análises de contaminação, análises quanto ao desenvolvimento (altura) e multiplicação das brotações foram realizadas (Tabelas 5, 6).

**Tabela 5.** Média da altura de brotações dos acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647, durante cinco subcultivos *in vitro*.

Tempo de cultivo (dias)	Altura (cm)											
	Subcultivos											
	1		2		3		4		5		Final	
	L*	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
7	0,0±0,0	0,6±0,1	0,3±0,0	0,5±0,1	0,4±0,2	0,7±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1
15	0,5±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	0,7±0,1	1,0±0,2	0,8±0,1	1,5±0,1	1,3±0,1	1,7±0,1	1,4±0,1	1,5±0,1	1,3±0,1
30	2,3±0,3	1,7±0,1	2,5±0,2	1,2±0,1	2,2±0,2	1,5±0,1	3,2±0,1	2,2±0,1	3,0±0,1	2,3±0,1	2,6±0,1	2,3±0,1

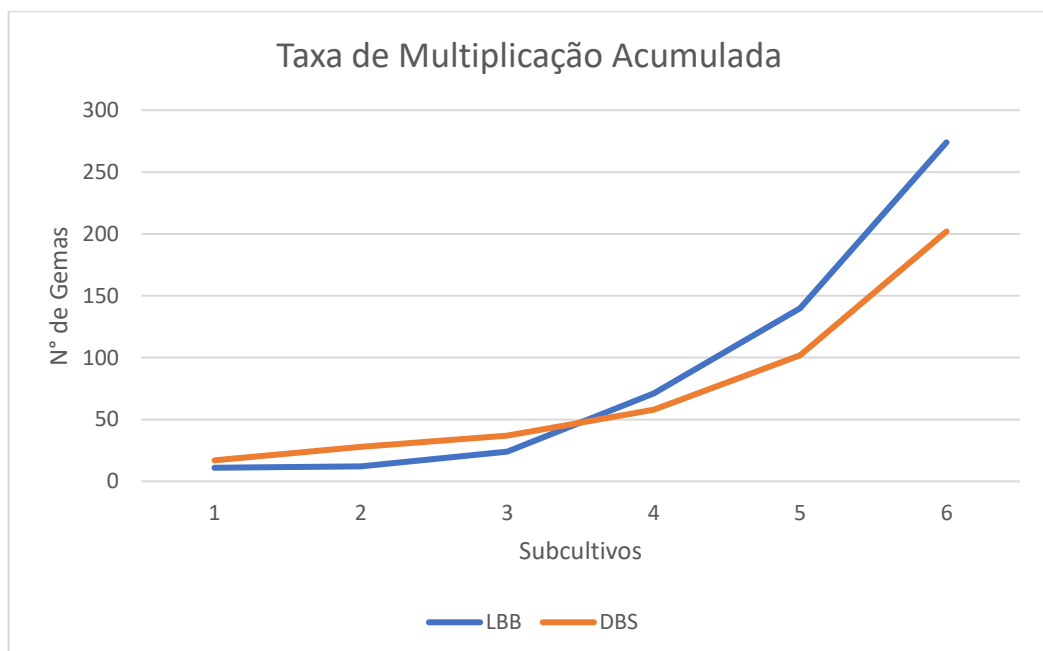
\*L (acesso LBB); D (acesso DBS647)

± Erro padrão

Comparando os dois acessos, percebe-se que o acesso LBB se desenvolve melhor que o acesso DBS647, apresentando brotações maiores no final do período de cada subcultivo (Tabela 5). O tamanho da brotação também exerce influência no número de gemas formadas e, na maioria dos casos, na taxa de multiplicação clonal (Tabela 6). No período dos seis subcultivos, o acesso LBB apresentou taxa de multiplicação acumulada de 274 novas brotações, enquanto o acesso DBS647 exibiu taxa de multiplicação acumulada de 202 novas brotações. Assim, os resultados mostram o potencial da cultura *in vitro*, confirmando sua capacidade de propagação e multiplicação clonal em curto período e espaço físico (Figura 5).

**Tabela 6.** Taxa de multiplicação clonal média de acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647, durante o período de limpeza bacteriana e após cinco subcultivos

Subcultivos	Taxa de multiplicação média	
	LBB	DBS647
<b>0</b>	-	-
<b>1</b>	3,7	4,3
<b>2</b>	2,0	1,8
<b>3</b>	2,0	1,3
<b>4</b>	3,0	1,6
<b>5</b>	2,0	1,8
<b>Final</b>	2,0	2,0



**Figura 5.** Taxa de multiplicação clonal acumulada de acessos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647, durante o período de limpeza bacteriana. Partindo-se de 3 microestacas foi alcançado 274 brotações para o acesso LBB, e partindo-se de 4 microestacas foi alcançado 202 brotações para o acesso DBS647.

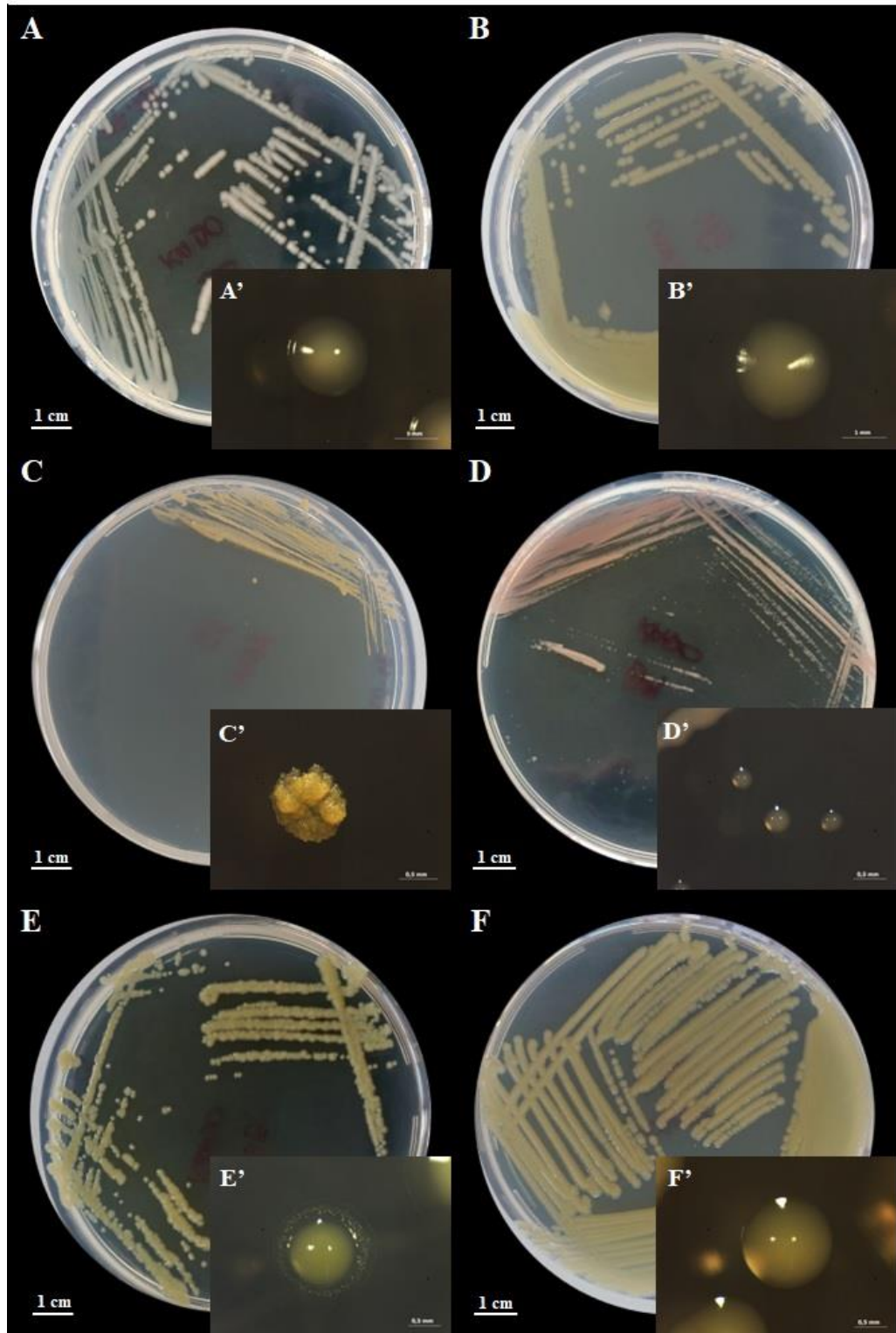
### 3.2 Identificação de bactérias endofíticas em *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

A partir do isolamento e purificação das bactérias oriundas do estabelecimento *in vitro* de *Vanilla phaeantha*, realizaram-se a caracterização morfológica de colônia e Teste de Reação Gram para distingui-las em gram-negativa ou gram-positiva por meio da reação com KOH 3%, mediante análise da resistência da parede celular bacteriana (Quadro 1). Em bactérias gram-positivas não ocorre a lise da parede celular, sendo não reagentes ao KOH, ao contrário do observado para bactérias gram-negativas, as quais têm suas paredes celulares destruídas pelo KOH e seu DNA exposto, formando um fio viscoso, e, portanto, são reagentes ao KOH. A classificação gram positiva ou negativa, é o primeiro passo para a identificação de bactérias, podendo definir qual a melhor agente bactericida a ser utilizado, já que gram-positivas apresentam a parede celular mais espessa e rígida, conseqüentemente mais difícil de ser rompida ou penetrada, diferente das gram-negativas que apresentam a parede celular mais fina e maleável.

Existe um grupo de microrganismos, gram-positivos e negativos, que habitam o solo e partes da planta, principalmente, a rizosfera, que promovem o crescimento vegetativo, proporcionam tolerância ao estresse abiótico e biótico, ajudam na nutrição e defesa, além de serem capazes de fixar Nitrogênio (N) atmosférico (VALENZUELA-ARAGÓN *et al.*, 2019; ROJAS-PADILLA *et al.*, 2020; CRUZ-CÁRDENAS *et al.*, 2021).

**Quadro 1.** Teste de Reação Gram e caracterização morfológica de colônia, das bactérias endofíticas isoladas e purificadas, em meio de KH, com 72 horas de crescimento à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. Características morfológicas de colônia, na seguinte ordem: tamanho, cor, forma, borda, elevação.

Bactéria	Gram	Características morfológicas de colônia
<b>B3</b>	Positiva	1 a 2 mm, branco creme, redonda, inteira, elevada
<b>B4</b>	Negativa	2 a 3 mm, amarelo creme, redonda, inteira, elevada
<b>B5</b>	Negativa	1 a 2 mm, laranja, enrugada, irregular, crateriforme
<b>B9</b>	Negativa	≤ 1 mm, rosa, redonda, inteira, elevada
<b>B15</b>	Negativa	1 a 2 mm, amarelo creme, redonda, inteira, elevada
<b>B16</b>	Negativa	1 a 2 mm, amarelo creme, redonda, inteira, elevada



**Figura 6.** Bactérias endofíticas isoladas e purificadas, em meio de KH, com 72 horas de crescimento à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , do cultivo *in vitro* de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., durante a fase de estabelecimento. A e A' – B3. B e B' – B4. C e C' – B5. D e D' – B9. E e E' – B15. F e F' – B16. Escalas: A, B, C, D, E e F – 1 cm. A' e B' – 1 mm. C', D', E' e F' – 0,5 mm.

Das seis diferentes amostras de DNA bacteriano enviadas para sequenciamento, três foram enquadradas por similaridade a gêneros conhecidos, e as outras três não foram identificadas quando comparadas às sequências já conhecidas em bancos de dados. De acordo com Drancourt *et al.* (2004) e Stackebrandt e Ebers (2006), para que cepas sejam consideradas da mesma espécie, o grau de identidade deve ser superior a 98,7%, e para que sejam consideradas pertencentes a um determinado gênero, a identidade deve ser superior a 97%. Nenhuma das amostras alcançaram identidade de 97% (Tabela 7), por isso não é possível confirmar sua identidade, porém pode-se dizer que são bactérias próximas filogenética e evolutivamente aos gêneros propostos (Figura 7), a partir do sequenciamento com o *primer* 16s rRNA.

Dos gêneros, geneticamente próximos, identificados, dois são caracterizados como fitopatogênicos, causadores de doenças (*Agrobacterium* sp. e *Herbaspirillum* sp.) (BALDANI *et al.*, 1997). Porém, podem ser considerados benéficos quando exercem o papel de fixadores de N atmosférico. Segundo Djordjevic *et al.* (1987), muitos fitopatógenos tornaram-se compatíveis com a planta hospedeira, durante o processo evolutivo, causando menos danos e promovendo algum benefício. O terceiro gênero, geneticamente próximo, identificado, (*Methylobacterium* sp.), caracterizado como endofítico, que pode habitar toda a extensão da planta, pode estar envolvido na fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, e interação com patógenos, promovendo o crescimento da planta e melhorando a atividade fotossintética (SY *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2002; CERVANTES-MARTÍNEZ *et al.*, 2004; MADHAIYAN *et al.*, 2006; MENNA *et al.*, 2006; MEENA *et al.*, 2012; DOURADO *et al.*, 2015; QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018). Ainda segundo Quambusch e Winkelmann (2018), o que condiciona os diferentes efeitos exercidos, pelos endofíticos, sobre a planta, são as condições ambientais abióticas, o genótipo do hospedeiro, e o estágio de desenvolvimento da planta.

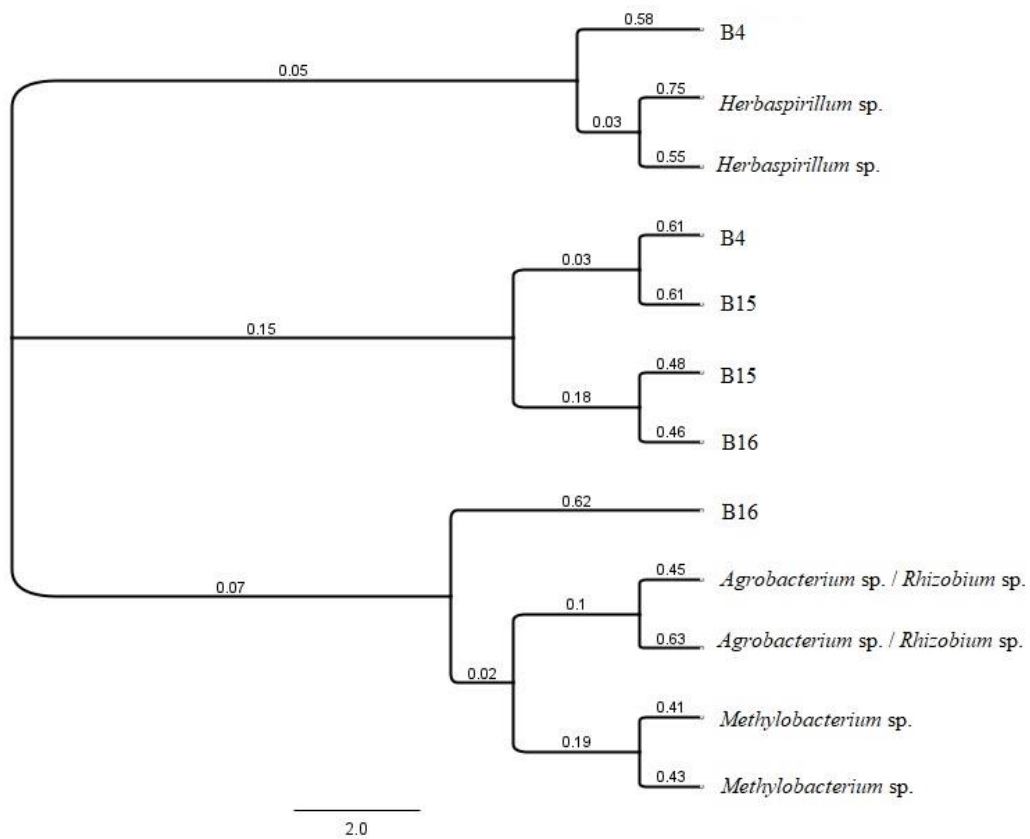


**Tabela 7.** Dados obtidos a partir do sequenciamento, com auxílio do primer 16S rRNA, de amostras de DNA bacteriano isolado de bactérias endofíticas oriundas de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., na fase de estabelecimento *in vitro*.

Bactéria	Gênero*	Grau de Identidade (%)	Fragmento (pb**)
B3	<i>Agrobacterium</i> sp.	76,9	1811
	<i>Rhizobium</i> sp.	76,9	
B4	-	0	927
B5	<i>Herbaspirillum</i> sp.	91,04	1100
B9	<i>Methylobacterium</i> sp.	89,27	1657
B15	-	0	1674
B16	-	0	684

\*Gênero proposto por similaridade das sequências isoladas com o banco de dados.

\*\*Número de pares de bases nitrogenadas



**Figura 7.** Relações evolutivas entre os possíveis gêneros de bactérias endofíticas oriundas de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f., na fase de estabelecimento *in vitro*, identificadas a partir do primer 16S rRNA.

Pelo fato do primer 16S rRNA se tratar de uma sequência generalista para identificação de bactérias (BOSSHARD *et al.*, 2003; CLARRIDGE, 2004), ele é frequentemente utilizado para sequenciamento e identificação a nível de gênero de isolados de DNA bacteriano não conhecidos. Diferentes espécies podem compartilhar identidade completa da sequência do

gene 16S rRNA (FOX *et al.*, 1992; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; BLACKWOOD *et al.*, 2004), o que pode explicar o alto grau de identidade exigido para confirmação de identidade. Assim, por apresentarem grau de identidade abaixo de 97%, as chances das amostras avaliadas serem espécies novas dentro do gênero aumentam. Para se chegar a um resultado mais preciso é necessário realizar o sequenciamento completo DNA de cada isolado bacteriano, pois quanto maior a quantidade de genes sequenciados, mais precisão se tem no cruzamento de informações com o banco de dados.

### 3.3 Multiplicação *in vitro* de espécies de baunilha

#### 3.3.1 Efeito de diferentes consistências do meio de cultivo (semissólida, dupla-fase e líquida) na multiplicação *in vitro* de baunilha

O teste de diferentes tipos de consistência do meio de cultura foi realizado com duas espécies de baunilha – *Vanilla phaeantha* e *Vanilla planifolia*.

Ambas as espécies apresentaram bom desenvolvimento no meio semissólido e dupla-fase, desenvolvendo mais de um broto por explante (Figura 8). O meio líquido, proporcionou resultados inferiores, caracterizados pela ausência do desenvolvimento dos brotos, além de aparência aclorofilada e hiper hídrica, diferentemente do relatado por George e Ravishankar (1997) e Manokari *et al.* (2021), que obtiveram melhor taxa de multiplicação em meio líquido de *Vanilla planifolia*. O resultado inesperado provavelmente está ligado ao fato do recipiente se manter estático durante o tempo de cultivo mantendo o explante totalmente imerso no meio líquido e dificulta as trocas gasosas, além da baixa disponibilidade de gases dissolvidos no meio líquido, diferente do método utilizado pelos autores, os quais relataram o uso de recipientes sob constante agitação.



**Figura 8.** Efeito de diferentes consistências do meio de cultura (semissólido, dupla-fase e líquido) sobre o desenvolvimento e multiplicação de brotações de duas espécies de baunilhas - *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews, após 90 dias de cultivo. A – Repetição, contendo um frasco com meio semissólido, um frasco com meio dupla-fase, um frasco com meio líquido, e cinco explantes por frasco. B – Tratamentos com *Vanilla planifolia*. C – Tratamentos com *Vanilla phaeantha*. Escala: A, B e C – 1,5 cm.

De acordo com a análise estatística (Tabela 8), os meios dupla-fase e semissólido foram os tratamentos que apresentaram melhores resultados quanto à produção de brotos por explante. O meio dupla-fase produziu, em média, mais brotos por explante ( $7,2 \pm 0,5$  para *Vanilla planifolia* e  $6,8 \pm 0,3$  para *Vanilla phaeantha*), comparado ao meio semissólido ( $5,7 \pm 0,2$  para *Vanilla planifolia* e  $4,8 \pm 0,3$  para *Vanilla phaeantha*), portanto, sob as condições de estudo, é o mais apropriado dentre os testados para multiplicação de espécies de *Vanilla*. Os dados obtidos corroboram com aqueles reportados por Oliveira *et al.* (2013) ao trabalhar com *Vanilla planifolia*. Esse sistema de meio de cultura, também, é utilizado com sucesso na cultura *in vitro* de outras espécies vegetais como, *Pyrus pyrifolia* (KADOTA *et al.*, 2001), *Malus prunifolia* (MACHADO *et al.*, 2004), *Pinus taeda* (PULLMAN; SKRYABINA, 2007), *Ananas comosus*, além de outras espécies de bromeliáceas (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012), e *Rauwolfia serpentine* (SENAPATI, 2015). Ele apresenta como vantagens o aumento na taxa de multiplicação de brotos na cultura *in vitro* (MORAES *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2004), além de promover maior crescimento de brotos regenerados (MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

**Tabela 8.** Média do número de brotos por explante de *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews e *Vanilla phaeantha* Rchb. f, cultivados em meio líquido, dupla-fase e semissólido, após 90 dias de cultivo

Tratamento	N° de Broto / Explante		Média
	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla phaeantha</i>	
Meio Líquido	$0,1 \pm 0,1$ cA	$0,0 \pm 0,0$ cA	0,1 c
Meio Dupla-Fase	$7,2 \pm 0,5$ aA	$6,8 \pm 0,3$ aA	7,0 a
Meio Semissólido	$5,7 \pm 0,2$ bA	$4,8 \pm 0,3$ bB	5,3 b
Média	4,3 A	3,9 A	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, e letras maiúsculas entre os genótipos, pelo teste de Tukey a 5% de significância.  $\pm$  Erro padrão.

Após a fase de multiplicação em meio líquido, dupla-fase e semissólido, os brotos formados nos tratamentos em meio dupla-fase e semissólido foram separados e transferidos para meio semissólido básico alongamento.

As análises estatísticas revelaram diferenças significativas entre as médias de altura de broto e enraizamento, apenas para *V. planifolia*, com destaque para os resultados oriundos do meio semissólido (Tabela 9). Possivelmente um desequilíbrio fisiológico ocasionado pela fase líquida do meio dupla-fase, como, por exemplo, a hiperidricidade pode explicar a diferença no desenvolvimento entre os tratamentos nessa espécie. Além desses resultados, a análise evidencia diferenças significativas entre as espécies, sendo a *V.*

*phaeantha* a espécie que melhor se desenvolveu independentemente da consistência do meio de cultura utilizada (Tabela 9). Essa diferença no desenvolvimento entre as espécies pode ser explicada por vários fatores como, por exemplo, a própria diferença genética.

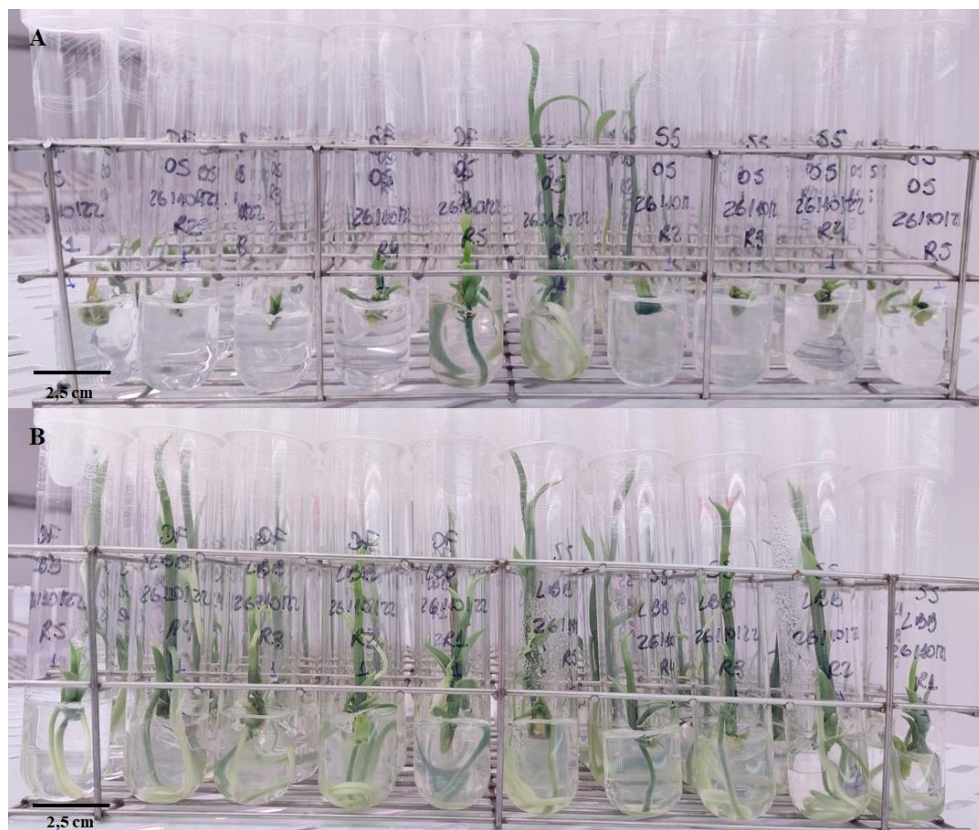
**Tabela 9.** Médias da altura e enraizamento de brotos de *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews e *Vanilla phaeantha* Rchb. f., na fase de alongamento, oriundos dos cultivos em meio dupla-fase e semissólido, após 60 dias de cultivo.

Tratamento	Altura (cm)		
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	Média
Meio Dupla-Fase	3,3 ± 0,7 bB	8,6 ± 0,7 aA	6,0 a
Meio Semissólido	6,0 ± 1,2 aB	8,9 ± 0,8 aA	7,5 a
Média	4,7 B	8,8 A	

Tratamento	Enraizamento		
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	Média
Meio Dupla-Fase	0,5 ± 0,1 bB	1,0 ± 0,0 aA	0,7 a
Meio Semissólido	0,7 ± 0,1 aB	1,0 ± 0,0 aA	0,9 a
Média	0,6 B	1,0 A	

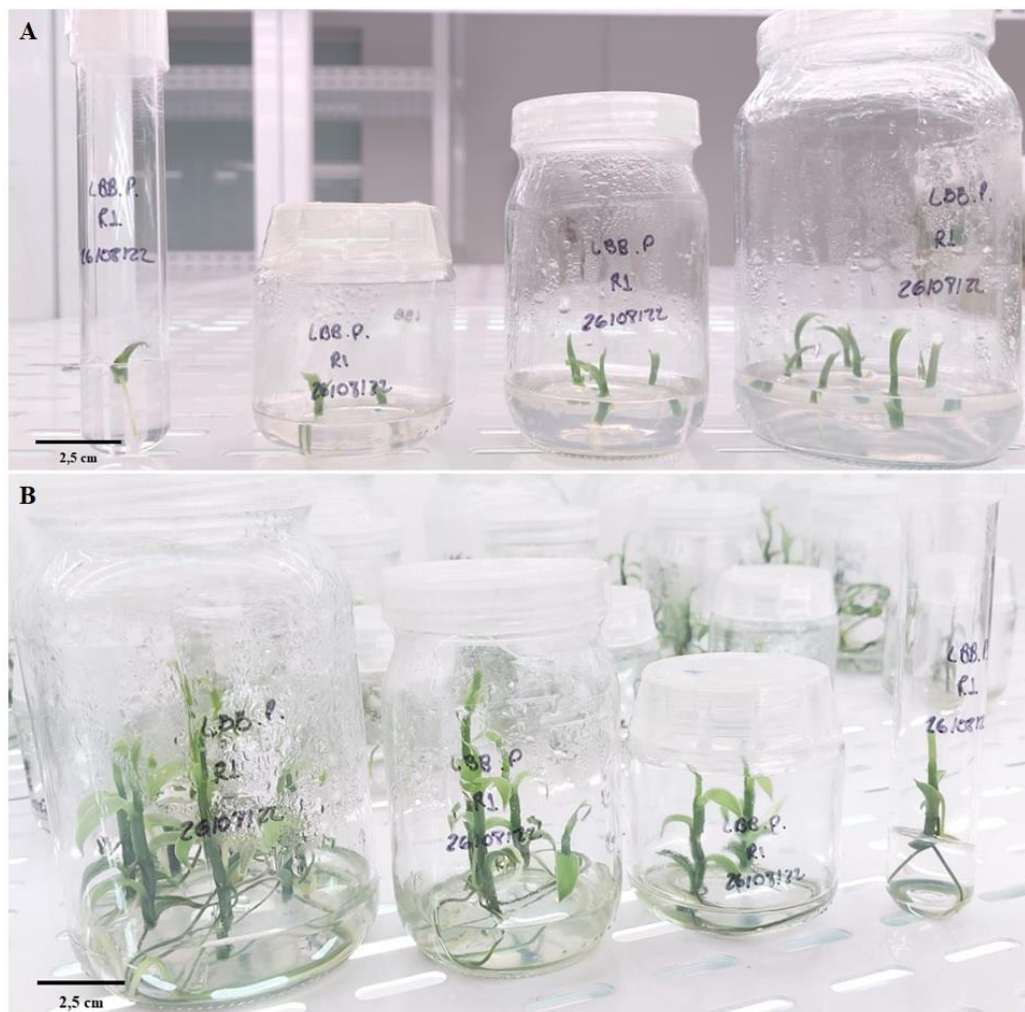
Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, e letras maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey a 5% de significância. ± Erro padrão.



**Figura 9.** Alongamento de brotos de duas espécies de baunilhas - *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews, oriundos do experimento em meio com diferentes consistências (semissólido, dupla-fase e líquido), após 60 dias de cultivo. A – Tratamentos com *Vanilla planifolia*. B – Tratamentos com *Vanilla phaeantha*. Escala: A e B – 2,5 cm.

### 3.3.2 Efeito do uso de diferentes modelos de recipientes de cultivo na multiplicação de baunilha

Para melhor entender a influência de diferentes modelos de recipientes de vidro (com diferentes capacidades) na multiplicação da baunilha, foi estabelecido um experimento com a espécie *Vanilla phaeantha*.



**Figura 10.** Influência de diferentes modelos de recipientes de vidro na multiplicação *in vitro* de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), após 30 dias de cultivo. A – Dia 1 do cultivo. B – Dia 30 do cultivo. Escala: A e B – 2,5 cm.

Após comparação das médias aritméticas da altura, número de gemas e número de raízes formadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 10). Assim, a espécie se mostrou igualmente capaz de se desenvolver de forma satisfatória em qualquer recipiente de vidro, independentemente do tamanho e volume (Figura 10). Portanto, a multiplicação clonal *in vitro* de *Vanilla phaeantha* pode ser

potencializada, poupando tempo e espaço, mediante o uso de recipientes com maior capacidade.

**Tabela 10.** Média de desenvolvimento da *Vanilla phaeantha* Rchb. f. em diferentes modelos de recipientes de vidro.

Tratamento	Altura (cm)	Nº de Gema	Nº de Raíz
<b>Tubo</b>	4,0 ± 0,3 a	3,8 ± 0,2 a	3,0 ± 0,2 a
<b>Pequeno</b>	3,8 ± 0,4 a	3,6 ± 0,3 a	2,6 ± 0,3 a
<b>Médio</b>	4,3 ± 0,2 a	3,9 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a
<b>Grande</b>	5,1 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 a	3,4 ± 0,1 a

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

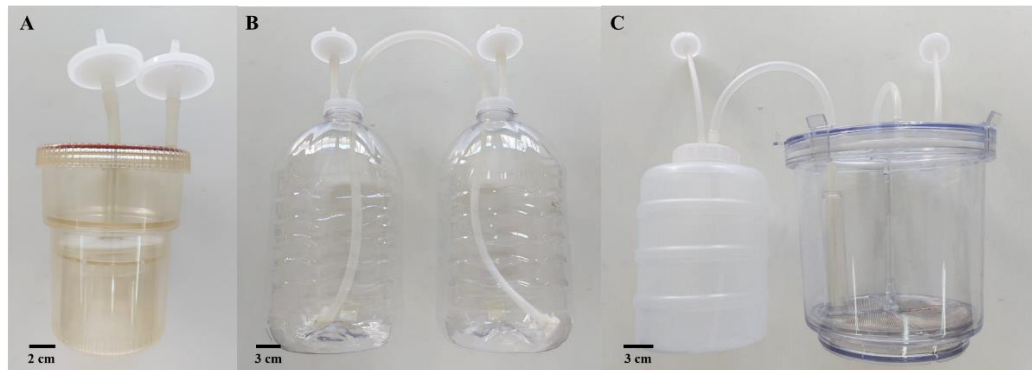
### 3.3.3 Multiplicação de brotações de baunilhas em diferentes modelos de biorreatores

Neste experimento foram testados diferentes modelos de sistema de imersão temporária (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>) (Figura 11), além do sistema tradicional de cultivo *in vitro*, meio semissólido em recipiente de vidro sobre a multiplicação clonal de *Vanilla phaeantha*. O objetivo foi identificar em qual sistema essa espécie de baunilha se desenvolve melhor, para uma possível produção em larga escala.

A formação de mais de um broto por explante era esperada, considerando a presença de BAP no meio. Para a variável formação de brotos novos por explante, o modelo RALM<sup>®</sup> foi o que gerou melhor resultado (8,2 ± 0,3) (Figura 13), seguido pelos modelos RITA<sup>®</sup> e o sistema tradicional, sem diferenças significativas entre si (4,9 ± 0,2 e 4,3 ± 0,6, respectivamente). Ainda quanto à formação de brotos, o modelo BIT<sup>®</sup> não proporcionou resultado satisfatório (1,2 ± 0,1), gerando brotos aclorofilados e com aparência hiperhídrica (Tabela 11). Os resultados obtidos destoam daqueles relatados por Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016). Segundo esses autores, o modelo BIT<sup>®</sup> superou o RITA<sup>®</sup> na produção de brotos de *Vanilla planifolia*. O modelo BIT<sup>®</sup>, também, se mostrou eficiente na produção de biomassa e alongamento de brotos de espécies de plantas medicinais relatados por De Carlo *et al.* (2021). Por outro lado, estão em concordância com os resultados apresentados por Ramos-Castellá *et al.* (2014), os quais reportaram a maior eficiência do modelo RITA<sup>®</sup> na multiplicação de baunilha (*Vanilla planifolia*). Ressalta-se a ausência de literatura sobre o desempenho do biorreator do modelo RALM<sup>®</sup>.

O não desenvolvimento de brotos no sistema BIT<sup>®</sup> pode ser explicado por diversas falhas que o sistema apresenta como, por exemplo, o refluxo do meio do recipiente de armazenamento para o recipiente de cultura fazendo com que os explantes fiquem em contato parcial com o meio líquido por mais tempo que o programado. Sreedhar *et al.* (2009)

e Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) relatam que a imersão parcial dos explantes em meio líquido pode causar a hiperidricidade em brotos de *Vanilla planifolia*. Além da contaminação mais frequente devido à dificuldade de limpeza e esterilização dos recipientes por não serem materiais autoclaváveis. Diante dessas desvantagens/gargalos, é importante a realização de otimizações futuras nesse sistema, de maneira a manter o baixo custo de produção, sem detrimento da sua funcionalidade.



**Figura 11.** Modelos de biorreatores, com sistema de imersão temporária, utilizados. A - RITA®. B - BIT®. C - RALM®. Escalas: A – 2 cm, B e C – 3 cm.



**Figura 12.** Cultivo de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.) em biorreator de imersão temporária. Escala: 4cm.



**Tabela 11.** Média do número de brotos por explante de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. cultivados em diferentes sistemas de imersão temporária (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>) e em frascos tradicionais (semissólido)

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

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



**Figura 13.** Avaliação da multiplicação clonal de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), com auxílio do biorreator de sistema de imersão temporária do modelo RALM<sup>®</sup>. Escala: 1 cm.

Na fase de alongamento e enraizamento das brotações, o sistema RALM<sup>®</sup> também proporcionou melhores resultados ( $1,0 \pm 0,0$  e  $0,5 \pm 0,1$ , respectivamente), seguido do sistema tradicional controle em frasco ( $0,6 \pm 0,1$ ) que se mostrou melhor que o sistema RITA<sup>®</sup> ( $0,3 \pm 0,1$ ), como pode ser observado na Tabela 12. Já o sistema BIT<sup>®</sup> foi ineficaz, sob as condições de estudo, para o alongamento e enraizamento de brotações de *Vanilla phaeantha*.

**Tabela 12.** Médias de altura e enraizamento de brotos de *Vanilla phaeantha* Rchb. f cultivados em diferentes biorreatores de imersão temporária (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup>) e em frascos tradicionais (semissólido), durante a fase de alongamento.

Tratamento	Altura (cm)	Enraizamento
Tradicional (controle)	0,6 ± 0,1 b	0,6 ± 0,1 a
RITA	0,3 ± 0,1 c	0,1 ± 0,1 b
RALM	1,0 ± 0,0 a	0,5 ± 0,1 a
BIT	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 b

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



**Figura 14.** Alongamento de brotos de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), multiplicados por 90 dias em diferentes modelos de biorreator de imersão temporária. A – Modelo RITA<sup>®</sup>. B – Modelo RALM<sup>®</sup>. C – Sistema tradicional (meio semissólido). Escala: 2 cm.

### 3.4 Enraizamento e aclimatização de plantas de baunilha

A espécie estudada, *Vanilla phaeantha*, apresenta alta taxa de enraizamento ( $\approx$  99,3% - dado obtido do teste de diferentes modelos de recipientes de vidro na multiplicação de baunilha) em meio básico, não havendo a necessidade de suplementação com auxinas.

De acordo com a análise de sobrevivência, todos os tratamentos, exceto o tratamento fibra de coco (FC, 50%), proporcionaram 100% de sobrevivência (Tabela 13). A menor taxa de sobrevivência proporcionada pelo tratamento Fibra de Coco (FC) provavelmente está relacionada ao fato desse substrato ser pobre em nutrientes, exercendo apenas a função de retenção de umidade, o que também pode ter refletido na altura das mudas aclimatizadas, as quais exibiram menores médias de altura ( $4,6 \pm 1,5$ ) em relação aos outros tratamentos.

Assim, o substrato FC isolado não é indicado quando usado isolado para o cultivo de *Vanilla phaeantha*.

**Tabela 13.** Percentual de sobrevivência e média da altura de mudas de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. aclimatizadas em diferentes substratos (SC – substrato comercial e FC – fibra de coco) combinados em variadas proporções.

Tratamento/proporção (v/v)	Sobrevivência	Altura (cm)
SC	1,0 ± 0,0 a	13,1 ± 0,7 a
FC	0,5 ± 0,2 b	4,6 ± 1,5 b
SC:FC (1:1)	1,0 ± 0,0 a	12,5 ± 0,6 a
SC:FC (2:1)	1,0 ± 0,0 a	12,6 ± 0,5 a
SC:FC (3:1)	1,0 ± 0,0 a	12,8 ± 0,6 a
SC:FC (1:2)	1,0 ± 0,0 a	10,9 ± 0,5 a
SC:FC (1:3)	1,0 ± 0,0 a	9,7 ± 0,8 a

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

SC - Substrato comercial; FC – Fibra de coco.



**Figura 15.** Avaliação do enraizamento e aclimatização, em diferentes substratos combinados em variadas proporções, de mudas de baunilha (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.). A – Substrato comercial e fibra de coco, e suas combinações. B – Mudanças oriundas do cultivo *in vitro*. C – Mudanças plantadas e mantidas em BOD. D – Mudanças aclimatizadas com 30 dias. E e F – Mudanças aclimatizadas com 90 dias, mantidas em casa de vegetação. Escala: B – 2 cm.

#### 4 CONCLUSÕES

Conclui-se que a limpeza clonal com Ampicilina Sódica proporcionou uma redução relevante da carga bacteriana em explantes de *Vanilla phaeantha*, sendo, portanto, uma importante alternativa para o estabelecimento *in vitro* da espécie. A *Vanilla phaeantha* Rchb. f. se desenvolve de forma satisfatória *in vitro* com a presença da Ampicilina Sódica em concentração de até 500 mg L<sup>-1</sup>. Ao final de cinco subcultivos é possível se obter até 274 brotações para o acesso LBB e 202 brotações para o acesso DBS647, ambos acessos da espécie *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

O sequenciamento a partir do *primer* 16S rRNA mostrou identidades próximas em nível de gêneros para as bactérias isoladas durante o estabelecimento *in vitro* de baunilha. Ressalta-se, entretanto, que ainda são necessários estudos para confirmação da identidade dos principais microrganismos endofíticos da espécie e se averiguar qual melhor antibiótico para cada tipo de bactéria, para se alcançar o máximo de limpeza ou a limpeza total desses microrganismos, sem gerar prejuízos para os explantes em cultivo, visto que na cultura *in vitro* esses microrganismos não são interessantes e podem atrapalhar o cultivo. Porém, a identificação correta também será importante para a preservação desses microrganismos, que podem beneficiar as plantas, e uso futuro em estudos para otimização da fase de aclimatização das mudas propagadas *in vitro*, com a inoculação desses microrganismos.

Na multiplicação clonal, constatou-se que o meio dupla-fase, sob condições de estudo, é o mais apropriado para a multiplicação das espécies de baunilhas estudadas, gerando maior número de brotações por explante. Não houve diferenças no desenvolvimento das brotações em diferentes recipientes, mostrando que a multiplicação *in vitro* de espécies de baunilhas pode ser potencializada com o uso de recipientes de maior capacidade. Dentre os modelos de biorreatores testados, o RALM<sup>®</sup> destacou-se, proporcionando alta taxa de multiplicação de brotos, 100% de alongamento e formação de plantas viáveis para o cultivo *ex vitro*, sendo, dessa forma, uma alternativa para a produção em escala massal de *Vanilla phaeantha*.

Além de futuros estudos para identificação de endofíticos, ainda são necessárias otimizações na multiplicação de mudas de baunilha, em larga escala, em biorreator RALM<sup>®</sup>, e investigações sobre a fidelidade genética dos clones multiplicados *in vitro*, buscando eventuais variações somaclonais.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAB, M.; YADOLLAHI, M.; HOSSEINI-MAZINANI, A.; BAGHERI, S. (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 103-110.
- ARAÚJO, W.; MARCON, J.; MACCHERONI, W. Jr.; ELSAS, J. D.v.; VUURDE, J. W. L.v.; AZEVEDO, J. L. (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914.
- BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J. (1997) Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N<sub>2</sub> em associação com plantas. **Documentos, 41, Seropédica: Embrapa-CNPAB**, p 25.
- BLACKWOOD, K. S.; TURENNE, C. Y.; HARMSSEN, D.; KABANI, A. M. (2004) Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of *Bacillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p.1626-1630.
- BOSSHARD, P. P.; ABELS, S.; ZBINDEN, R.; BOTTGER, E. C.; ALTWEGG, M. (2003) Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4134-4140.
- BRAMEL, P.; FREY, F. (2021) Global strategy for the conservation and use of Vanilla genetic resources. **Global Crop Diversity Trust**, Germany.
- CASSELLS, A. C. (2011). Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, **CRC Press**, cap. 17, p. 223-238.
- CERVANTES-MARTINEZ, J.; LÓPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. (2004) Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, v. 166, n. 4, p. 889-892.
- CLARRIDGE, J. E. (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862.
- CRUZ-CÁRDENAS, C. I.; MOLINA, L. X. Z.; CANCINO, G. S.; VILLALOBOS, S. S.; ANAYA, E. R.; DÍAZ, I. F. C.; RAMÍREZ, S. R. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, v. 12, n. 5, p. 899-913.

- DE CARLO, A.; TARRAF, W.; LAMBARDI, M.; BENELLI, C. (2021) Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2414.
- DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. (2006) Conservation of *Vanilla* species, in vitro. **Scientia Horticulturae**. v. 110, n. 2, p. 175-180.
- DJORDJEVIC, M. A.; GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. (1987) *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 25, p. 145-168.
- DONNARUMMA, F.; CAPUANA, M.; VETTORI, C.; PETRINI, G.; GIANNINI, R.; INDORATO, C.; MASTROMEI, G. (2011) Isolation and characterisation of bacterial colonies from seeds and in vitro cultures of *Fraxinus* spp. from Italian sites. **Plant Biology**, v. 13, p. 169-176.
- DOURADO, M. N.; NEVES, A. A. C.; SANTOS, D. S.; ARAÚJO, W. L. (2015) Biotechnological and Agronomic Potential of Endophytic Pink-Pigmented Methylophilic *Methylobacterium* spp. **BioMed Research International**.
- DRANCOURT, M.; BERGER, P.; RAOULT, D. (2004) Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2197-2202.
- EL-BANNA, A. N.; EL-MAHROUK, M. E.; DEWIR, Y. H.; FARID, M. A.; ABOU ELYAZID, D. M.; SCHUMACHER, H. M. (2021) Endophytic Bacteria in Banana In vitro Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival. **Horticulturae**, v. 7, n. 12, p. 526.
- FERRARA, L. (2019) Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*: A narrative review. **International Journal of Medical Reviews**. v.7(1), p. 22-26.
- FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. JR. (1992) How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170.
- GANTAIT, S.; KUNDU, S. (2017) In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 39, n. 9, p. 1-19.
- GEORGE, P. S.; RAVISHANKAR, G. A. (1997) In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 490-494.
- HABIBA, U.; REZA, S.; SAHA, M. L.; KHAN, M. R.; HADIUZZAMAN, S. (2002) Endogenous Bacterial Contamination During In vitro Culture of Table Banana: Identification and Prevention. **Plant Tissue Culture**, v. 12, n. 2, p. 117-124.

- HOLFORD, P. Ç.; NEWBURY, H. J. (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Anturrrhinum manjus*. **Plant Cell Report**, v.11, p. 93-96.
- HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A.; MATOS G. B. (2006) Cultivo de baunilha: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**.
- IUCN (2022) **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-2. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 31 de agosto de 2023.
- JENA, R. C.; SAMAL, K. C. (2011) Endogenous microbial contamination during *in vitro* culture of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]: identification and prevention. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 6, p. 1725-1731.
- JOHANSEN, D. A. (1940) **Plant microtechnique**. New York, Mcgraw-Hill Book, p. 523.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). **Plant Cell Report**, v. 21, p. 282-286.
- LEE-ESPINOSA, H. E.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; GARCÍA-ROSAS, B.; CÓRDOVA-CONTRERAS, A. L.; LAGUNA-CERDA, A.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; BARAHONA-PÉREZ, L. F.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; SANTANA-BUZZY, N. (2008) *In vitro* Clonal Propagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* ‘Andrews’). **Hortscience**. v. 43(2), p. 454-458.
- LOZANO R. M. A. (2014) Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de vainillas mexicanas. **Centro de Investigaciones Tropicales**, p.100.
- MACHADO, M. P.; CARVALHO, C. D.; BIASI, L. A. (2004) Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 69-72.
- MADHAIYAN, M.; SURESH REDDY, B. V.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; TONGMIN SA Plant Growth–Promoting *Methylobacterium* Induces Defense Responses in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Compared with Rot Pathogens. **Current Microbiology**, v. 53, p. 270-276.
- MANOKARI, M.; PRIYADHARSHINI, S.; JOGAM, P.; ABHIJIT DEY; SHEKHAWAT, S. M. (2021) Meta-topolin and liquid medium mediated enhanced micropropagation via *ex vitro* rooting in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 146, p. 69-82.
- MARTÍNEZ, S. F.; CASTILLO, C. M.; CASAS, J. L. (2012) *In vitro* propagation of *Helianthemum marminorense*. **Journal of Plant Biochemical and Biotechnology**, v. 21, p. 300-304.



- MEENA, K. K.; KUMAR, M.; KALYUZHAYYA, M. G.; YANDIGERI, M. S.; SINGH, D. P.; SAXENA, A. K.; ARORA, D. K. (2012) Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 777-786.
- MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. (2009) Efficient in vitro plant regeneration, flowering and fruiting dwarf tomato c.v. micro-msk. **Plant omics journal**, v.2, p. 98-102.
- MELNICK, R.; BAILEY, B.; BACKMAN, P. (2012) Bacterial Endophytes of Perennial Crops for Management of Plant Disease. In: MAHESHWARI, M.; SARAF, A. A. Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity. Ahmedabad, India: **Springer**. p. 49-75.
- MENEZES, T. P.; GOMES, W. A.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. (2012) Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**. v.28(6), p.868-876.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332.
- MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; LIMA DA SILVA, A. (2004) Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura "dupla-fase". Revista Brasileira de Fruticultura, v. 26, p. 403-405.
- NOGUEIRA, J. S.; COSTA, F. H. S.; VALE, P. A. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2017) Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: DRUMOND, P. M.; WIEDEMAN, G. (Orgs). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH. p.103-129.
- OLIVEIRA, S. O. D.; SAYD, R. M.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (2013) A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204-209.
- Orchidaceae in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>>. Acesso em: 31 de agosto de 2023.
- POWO (2023). Plants of the World Online. **Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>> Acesso em: 03 de agosto de 2023.
- PULLMAN, G. S.; SKRYABINA, A. (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. **Plant Cell Report**, v. 26, p. 873-887.

- QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. (2018) Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Nature, vo. 1815, p. 69-88.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 2, p. 154-160.
- RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. (2014) Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 50, p. 576-581.
- ROJAS PADILLA, J.; CHAPARRO ENCINAS, L. A.; ROBLES MONTOYA, R. I.; SANTOS VILLALOBOS, S. (2020) Promoción de crecimiento en trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) por la co-inoculación de cepas nativas de *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México. **Nova scientia**, v. 12, n. 24.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Review: Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. **MPMI, The American Phytopathological Society**, v. 19, n. 8, p. 827-837.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. (2003) Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1035-1043.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; LIMA, E. C. A.; DA SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. (2012) Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 109, p. 263-269.
- SENAPATI, S. K. (2015) A Double Phase Culture System: An Economic and Time Saving Protocol for In vitro Propagation of Plant. **SAJ Biotechnology**, v. 2, n. 1.
- SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D.; SALOMÃO, L. C. C.; SILVA, F. F.; BARROS, Z. J. (2013) Micropropagação de bananeira 'Maça', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, v. 60, n. 6, p. 745-751.

- SPINOSO-CASTILLO, J. L.; CHAVEZ-SANTOSCOY, R. A.; BOGDANCHIKOVA, N.; PÉREZ-SATO, J. A.; MORALES-RAMOS, V.; BELLO-BELLO, J. J. (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 129, p. 195-207.
- SREEDHAR, R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. (2009) Hyperhydricity related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 46-57.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849.
- STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. (2001) Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214-220.
- VALENZUELA-ARAGON, B.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOYO, G.; ARELLANO-WATTENBARGER, G. L.; SANTOS-VILLALOBOS, S. (2019) Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. **Plant Soil**, v. 435, p. 367-384.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, p. 697-703.

## **CAPÍTULO II**

### **CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES DE BAUNILHA**

**(*Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews)**

## RESUMO

A conservação de espécies de baunilha tem importância e interesse significativos dentro da comunidade científica. Isso se deve ao fato de que as culturas de baunilha consistem principalmente de clones com variabilidade genética limitada, tornando-os suscetíveis a fatores bióticos e abióticos. Por exemplo, eles são vulneráveis a ataques de *Fusarium oxysporum*, um patógeno responsável por perdas substanciais de produção. Além disso, populações silvestres de certas espécies, como *Vanilla planifolia*, estão enfrentando a ameaça de extinção devido ao desmatamento e práticas inadequadas de manejo. Neste contexto, a conservação *in vitro* surge como uma estratégia e alternativa viável para o estabelecimento de bancos de germoplasma para salvaguardar várias espécies de baunilha. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a conservação *in vitro* de espécies de baunilha em um banco de germoplasma, utilizando a técnica bem estabelecida *in vitro*, conhecida por suas características de crescimento lento. Para atingir esse objetivo, foram realizados experimentos para investigar dois fatores críticos que influenciam o crescimento *in vitro*: o tipo baseado na técnica *in vitro* conhecido por seu crescimento lento. Para isso, dois fatores envolvidos com o crescimento *in vitro* foram testados: o tipo de carboidrato (sacarose e sorbitol) e suas concentrações (0; 43,8 e 87,6 mM L<sup>-1</sup>) e em várias combinações em meio MS, e três temperaturas (10, 20 e 25°C). Verificou-se que a adição de 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sacarose em combinação com 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol ao meio de cultura, juntamente com o cultivo a 20°C, representa condição ideal para a conservação *in vitro* de espécies de baunilha. Essas condições facilitam o crescimento lento sem comprometer a capacidade fotossintética das microplantas.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, banco de germoplasma, conservação *in vitro*, crescimento lento.

## ABSTRACT

The conservation of vanilla species holds significant importance and interest within the scientific community. This is due to the fact that world's vanilla crops primarily consist of clones with limited genetic variability, rendering them susceptible to both biotic and abiotic factors. For instance, they are vulnerable to attacks from *Fusarium oxysporum*, a pathogen responsible for substantial production losses. Furthermore, wild populations of certain species, such as *Vanilla planifolia*, are facing the threat of extinction due to deforestation and inadequate management practices. In this context, in vitro conservation emerges as a viable alternative strategy for the establishment of germplasm banks to safeguard various vanilla species. The objective of this study was to develop an efficient protocol for the in vitro conservation of vanilla species in a germplasm bank, utilizing the well-established in vitro technique known for its slow growth characteristics. To achieve this objective, experiments were conducted to investigate two critical factors influencing in vitro growth: the type based on the in vitro technique known for its slow growth. For this, two factors involved with in vitro growth were tested: the type of carbohydrate (sucrose and sorbitol) and its concentrations (0; 43,8 and 87,6 mM L<sup>-1</sup>) and in various combinations in MS medium, and three temperatures (10, 20 and 25°C). It was verified that the addition of 43.8 mM L<sup>-1</sup> of sucrose in combination with 43.8 mM L<sup>-1</sup> of sorbitol to the culture medium, coupled with cultivation at 20°C, represents the optimal condition for the in vitro conservation of vanilla species. These conditions facilitate slow growth without compromising the photosynthetic capacity of the microplants.

**Keywords:** Orchidaceae, germplasm bank, in vitro conservation, slow-growth.

## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, os recursos genéticos são conservados em bancos e coleções de germoplasma para uso imediato ou futuro (SANTOS; BETTENCOURT, 2002). A conservação de espécies de baunilha é de grande importância e interesse, visto que os cultivos mundiais são compostos por clones com baixa variabilidade genética, vulneráveis a fatores bióticos e abióticos como, por exemplo, ao ataque do patógeno *Fusarium oxysporum*, que causa perda de produção (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016). Além do mais, populações silvestres de algumas espécies, como a *Vanilla planifolia*, estão em risco de extinção em seus habitats naturais, devido ao desmatamento e manejo inadequado (SOTOARENAS, 1999; BORY *et al.*, 2008).

De acordo com Veiga *et al.* (2006), a conservação *ex situ*, caracterizada pela coleta de partes da planta para conservação de forma artificial (NICK *et al.*, 2010; KAPAI *et al.*, 2010), possui várias modalidades, como a conservação *in vitro*, coleções de campo, em câmaras frias e em nitrogênio líquido (criopreservação). Segundo Kendon *et al.* (2017), a cultura de tecidos vegetais é uma estratégia que se mostra eficiente no estabelecimento de bancos de germoplasmas *in vitro* para conservação de várias espécies que apresentam propagação vegetativa ou sementes recalcitrantes (MATSUMOTO *et al.*, 2010), conservando exemplares livres de patógenos e genética conservada, em um espaço reduzido sob condições controladas durante vários meses, e até anos (CRUZ-CRUZ *et al.*, 2013).

Para que se alcance o sucesso no processo de conservação, protocolos adaptados para cada espécie são necessários, com alterações no ambiente de cultivo, como, redução da intensidade luminosa, fotoperíodo, trocas gasosas e temperatura, e modificação no meio de cultura por meio da adição de reguladores vegetais e agentes osmóticos, e redução dos componentes salinos e orgânicos, visto que o objetivo é diminuir o metabolismo retardando o crescimento (ENGELMANN, 1991; VILLALOBOS *et al.*, 1991; WITHERS; WILLIAMS, 1998; LEMOS *et al.*, 2002; LIMA-BRITO *et al.*, 2011; THAKUR *et al.*, 2015; TREJGEL *et al.*, 2015; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018). Os agentes osmóticos como a sacarose, o manitol e o sorbitol, reduzem o potencial hídrico do meio de cultura, inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante, conseqüentemente limitando o crescimento (ENGELMANN, 1991; CALDAS *et al.*, 1998). Porém, a sacarose, além de ser um regulador osmótico, também, é utilizada como fonte de energia no cultivo, ao contrário, por exemplo, do sorbitol que não é metabolizado por algumas espécies vegetais (GEORGE, 1993; JAIN *et al.*, 1997).

Uma das formas de avaliar a efetividade de cada protocolo para cada espécie estudada é a análise de clorofila e carotenoides, que são pigmentos capazes de absorver a radiação visível desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial para a sobrevivência das plantas (SEIFERMAN-HARMS, 1987). A baixa quantidade desses pigmentos pode estar relacionada a um possível estresse fisiológico desencadeado por diversos fatores, como luminosidade, temperatura, tipo e concentração de carboidrato, entre outros.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver protocolos eficientes para conservação de espécies de baunilha em banco de germoplasma, sob condições *in vitro* (crescimento lento).



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Conservação *In vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

### 2.1 Conservação *in vitro*

#### 2.1.1 Efeito de temperatura e carboidrato sobre o crescimento *in vitro* de espécies de baunilha

Para o experimento de conservação *in vitro* foram utilizados explantes de duas espécies de baunilha, *Vanilla planifolia* e *Vanilla phaeantha*, disponíveis na coleção de conservação de germoplasma *in vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Foram testadas três temperaturas: 10°C, 20°C e 25°C. Como meio de cultura, foi utilizado o meio básico de Murashige e Skoog (MS, 1962). Como complementação do meio, foi testada a combinação de dois tipos de carboidratos– sacarose e sorbitol, em quatro concentrações diferentes: 87,6 mM L<sup>-1</sup> de sacarose mais 0 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol; 0 mM L<sup>-1</sup> de sacarose mais 87,6 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol; 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sacarose mais 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol, e; 87,6 mM L<sup>-1</sup> de sacarose mais 87,6 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol. Foram adicionados em todos os tratamentos 2,3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel ao meio. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, a qual foi realizada por 20 minutos, sob 1,3 atm de pressão e à 121 °C. As condições do cultivo dos explantes foram de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Nesse experimento foram estabelecidas 6 repetições por tratamento de cada acesso, sendo cada repetição formada por quatro tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio e uma brotação de aproximadamente 1 cm de altura e uma gema agilar por tubo. As análises foram realizadas a cada 30 dias, durante 12 meses, com base nas seguintes variáveis: sobrevivência, altura de broto novo (cm), número de gemas e número de raízes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, pelo pacote disponível no programa SISVAR. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{x + 0,5}$  para dados numéricos, e  $\arcsen\sqrt{x \div 100}$  para dados de percentagem.

### 2.1.2 Análise de clorofila e carotenoides de plantas de baunilha conservadas *in vitro*

Para o teste de clorofila A, clorofila B e carotenoides, amostras foram retiradas de folhas de brotações de baunilha com 12 meses de cultivo em diferentes temperaturas e carboidratos (tratamentos supracitados), com o objetivo de avaliar a ocorrência de possível estresse fisiológico causado pelos tratamentos.

As amostras consistiram em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>, retirados da região central de folhas, alocadas na região mediana da parte aérea da brotação. Em seguida, as amostras foram colocadas em *eppendorf* de 2 mL, completados com Dimetilformamida (DMF), e mantidos em refrigerador por 48 horas, até a completa extração da clorofila. Após as 48 horas de extração, sob refrigeração, o líquido formado foi transferido para cubetas de quartzo e colocados em espectrofotômetro (Uv Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu), para leitura da absorbância (Ab) em três comprimentos de onda ( $\lambda$ ): 663,8 nm, 646,8 nm e 480 nm.

Para os cálculos de concentração de clorofila A, clorofila B e carotenoides, foram utilizadas as seguintes fórmulas matemáticas, onde Ab, Vol e A são, respectivamente, absorbância, volume (2 mL) e área (1 cm<sup>2</sup>):

$$\text{Clorofila A} = (12 * \text{Ab}_{663,8} - 3,11 * \text{Ab}_{646,8}) * \text{Vol} / A$$

$$\text{Clorofila B} = (20,78 * \text{Ab}_{646,8} - 4,88 * \text{Ab}_{663,8}) * \text{Vol} / A$$

$$\text{Carotenóides} = (((1000 * \text{Clorofila A} - 1,12 * \text{Clorofila B} - 34,07 * \text{Ab}_{480}) / 245) * 2) / A$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, pelo pacote disponível no programa SISVAR. Os dados considerados anormais pelo teste Shapiro-Wilk foram previamente transformados de acordo com  $\sqrt{x + 0,5}$  para dados numéricos, e  $\arcsen \sqrt{x \div 100}$  para dados de percentagem.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

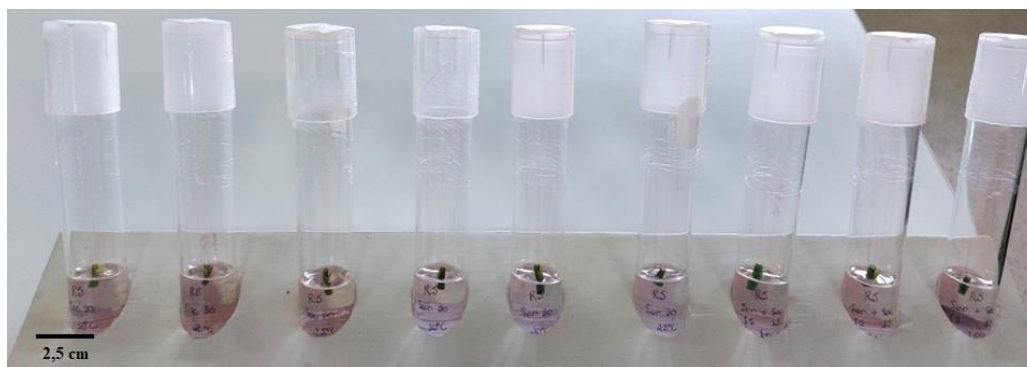
#### 3.1 Conservação *in vitro*

##### 3.1.1 Efeito da temperatura e carboidratos sobre o crescimento *in vitro* de espécies de baunilha

O experimento de conservação *in vitro*, sob condições de crescimento lento, foi realizado com duas espécies de baunilha – *Vanilla planifolia* e *Vanilla phaeantha* (Figura 1). Na conservação *in vitro*, objetiva-se o crescimento lento das plantas, por curto a médio prazo, e o prolongamento do intervalo de tempo entre os subcultivos (CHA-UM; KIRDMANEE, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2014; CHAUHAN *et al.*, 2019), sem detrimento da sua qualidade fisiológica e genética. Para isso são utilizadas várias estratégias, como a adição de agentes osmóticos e a redução da temperatura. A adição de agentes osmóticos tem como objetivo reduzir o potencial hídrico do meio de cultura, dificultando a absorção de água e nutrientes pelo explante, limitando o crescimento da cultura (CALDAS *et al.*, 1998; ENGELMANN, 1991; LIMA-BRITO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016; CHAUHAN *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2021). Similarmente, a redução da temperatura visa reduzir o metabolismo vegetal e, conseqüentemente, a taxa de crescimento da cultura conservada, de maneira diminuir a frequência de subcultivos e garantir a conservação por um período maior quanto possível. Segundo Engelmann (1991), Villalobos *et al.* (1991), e Lemos *et al.* (2002), a redução da temperatura pode minimizar os riscos de contaminação.

Conforme os resultados obtidos, os tratamentos com diferentes tipos de carboidratos, combinados entre si, não interferem significativamente na sobrevivência das brotações (Tabela 1). Porém o fator temperatura foi o principal responsável pela mortalidade de 100% das brotações cultivadas sob 10°C, independentemente do carboidrato utilizado, sendo, portanto, uma temperatura inviável para conservação das espécies de baunilha investigadas.

A análise do efeito das temperaturas de 20 e 25°C, dentro de cada tratamento de carboidrato, sobre a sobrevivência das brotações, não revelou diferenças estatísticas significativas entre elas, exceto para o tratamento com sorbitol isolado (0 sacarose + 87,6 sorbitol). Baunilhas cultivadas nesse tratamento, sob 20°C, apresentaram taxa de mortalidade superior em comparação aos demais tratamentos.



**Figura 1.** Aspecto dos explantes de baunilha no primeiro dia de conservação *in vitro* sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose e/ou sorbitol. Escala: 2,5 cm.

**Tabela 1.** Percentual de sobrevivência de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meios de cultivo suplementados com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	0±0 aB	100±0 aA	92±9 aA	64 a
0 sac + 87,6 sor	0±0 aC	50±15 bB	75±13 aA	41,6 b
43,8 sac + 43,8 sor	0±0 aB	83±11 aA	92±9 aA	58,3 a
87,6 sac + 87,6 sor	0±0 aB	100±0 aA	92±9 aA	64 a
<b>Média</b>	0 B	83,3 A	87,8 A	

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

Quanto ao desenvolvimento das brotações, não se verificou diferença entre os tratamentos com diferentes carboidratos, exceto para o tratamento com sorbitol isolado (0 sacarose + 87,6 sorbitol), quando avaliado considerando-se as temperaturas 20 e 25°C, que proporcionou baixo desenvolvimento (Tabela 2). Uma possível explicação para esse resultado, é pelo fato do sorbitol ser um tipo de carboidrato que geralmente não é assimilado por algumas espécies (GEORGE, 1993), o que compromete o crescimento/desenvolvimento do vegetal. Em relação à temperatura, em 25°C, as brotações se desenvolvem melhor, apresentando maior altura, conseqüentemente maior número de gemas, e melhor enraizamento, se comparada à temperatura de 20°C. Considerando-se o objetivo da conservação *in vitro* (supracitado), o cultivo sob 20°C em qualquer um dos tratamentos de carboidratos (Tabela 2), exceto naquele com sorbitol isolado (0 sacarose + 87,6 sorbitol), por comprometer a taxa de sobrevivência (Tabela 1), é apropriado para conservação de baunilha por até 12 meses.

Segundo Divakaran *et al.* (2006), a conservação de espécies *Vanilla* pode se estender por mais de 7 anos, com subcultivos anuais, mantendo boa taxa de regeneração e qualidade genética dos brotos, após esse período. Ao contrário do que apresentado nestes resultados, os autores mostram que a combinação de sacarose e um agente osmótico, no caso manitol, influencia na sobrevivência e desenvolvimento das brotações de *Vanilla*, proporcionando um aumento significativo na sobrevivência e estabilidade na taxa de crescimento das brotações.

**Tabela 2.** Média de desenvolvimento de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meios de cultivo suplementados com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	Altura (cm)			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	1,16±0,28 aC	7,57±0,93 aB	13,15±1,22 aA	7,29 a
0 sac + 87,6 sor	0,68±0,22 aB	1,53±0,33 bAB	3,60±0,87 bA	1,94 b
43,8 sac + 43,8 sor	0,81±0,20 aC	6,03±0,69 aB	11,38±0,85 aA	6,07 a
87,6 sac + 87,6 sor	0,93±0,23 aC	7,78±0,94 aB	12,87±1,51 aA	7,19 a
<b>Média</b>	0,89 C	5,73 B	10,25 A	
Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	N° Gema			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	1,17±0,17 aC	6,50±0,72 aB	8,83±0,84 aA	5,50 a
0 sac + 87,6 sor	0,58±0,19 aB	2,67±0,70 bB	6,25±1,52 bA	3,17 b
43,8 sac + 43,8 sor	1,00±0,12 aC	6,58±0,81 aB	9,50±0,65 aA	5,69 a
87,6 sac + 87,6 sor	1,08±0,19 aB	8,00±0,86 aA	9,25±1,14 aA	6,11 a
<b>Média</b>	0,96 C	5,94 B	8,46 A	
Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	N° Raiz			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	0,67±0,19 aC	5,42±0,63 aB	8,75±0,70 aA	4,94 a
0 sac + 87,6 sor	0,33±0,14 aA	0,92±0,36 bA	1,50±0,44 bA	0,92 b
43,8 sac + 43,8 sor	0,67±0,22 aC	5,25±0,54 aB	8,25±0,73 aA	4,72 a
87,6 sac + 87,6 sor	0,58±0,15 aC	6,25±0,73 aB	8,33±1,17 aA	5,06 a
<b>Média</b>	0,56 C	4,46 B	6,71 A	

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

Quando o comportamento das espécies de baunilha sob condições de crescimento lento é comparado, os resultados mostram que *Vanilla phaeantha* é mais tolerante às temperaturas testadas, exceto quando conservadas sob 10°C, independentemente do carboidrato utilizado (Tabela 3). Já segundo à análise do efeito dos tratamentos com diferentes combinações de carboidratos, independentemente da temperatura de conservação, as espécies não apresentam diferenças importantes na taxa de sobrevivência, exceto para *Vanilla planifolia*, quando cultivada em sorbitol isolado (0 sacarose + 87,6

sorbitol), que apresentou alta mortalidade (Tabela 3). A questão genética pode ser a responsável por essas diferenças.

**Tabela 3.** Percentual de sobrevivência de brotações de espécies de baunilha, *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews, conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

Tratamento	Sobrevivência (%)		
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	Média
10°C	0±0 bA	0±0 bA	0 b
20°C	71±9 aB	96±4 aA	83,5 a
25°C	75±9 aB	100±0 aA	87,5 a
<b>Média</b>	48,6 B	65,3 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	61±12 aA	67±11 aA	64 a
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	17±9 bB	67±11 aA	42 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	56±12 aA	61±12 aA	58,5 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	61±12 aA	67±11 aA	64 a
<b>Média</b>	48,7 B	65,5 A	

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

Quanto ao crescimento/desenvolvimento, de modo geral, *Vanilla phaeantha* apresenta, independentemente do tratamento testado, melhor desempenho que *Vanilla planifolia* (Tabela 4). Quanto a conservação em si, a temperatura de 20°C é apropriada para a conservação das duas espécies de baunilhas estudadas, por reduzi significativamente, o metabolismo/crescimento vegetal, possibilitando a conservação *in vitro* por, até 12 meses.

**Tabela 4.** Média de desenvolvimento de brotações de espécies de baunilha, *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews, conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

Tratamento	Altura (cm)		Média
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	
10°C	0,86±0,19 cA	0,93±0,14 cA	0,89 c
20°C	4,81±0,81 bB	6,64±0,61 bA	5,73 b
25°C	8,52±1,20 aB	11,98±0,93 aA	10,25 a
<b>Média</b>	4,73 B	6,51 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	6,53±1,35 aA	8,06±1,41 aA	7,29 a
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	1,07±0,26 bA	2,81±0,64 bA	1,93 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	5,72±1,20 aA	6,42±0,12 aA	6,07 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	5,62±1,32 aB	8,77±1,47 aA	7,19 a
<b>Média</b>	4,73 B	6,51 A	
Tratamento	N° Gema		Média
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	
10°C	0,92±0,15 cA	1,00±0,10 cA	0,95 c
20°C	4,17±0,59 bB	7,71±0,55 bA	5,94 b
25°C	6,13±0,71 aB	10,79±0,55 aA	8,46 a
<b>Média</b>	3,74 B	6,50 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	4,61±0,87 aB	6,39±0,95 abA	5,50 a
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	1,44±0,48 bB	4,89±1,13 bA	3,17 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	4,56±0,80 aB	6,83±1,07 abA	5,69 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	4,33±0,79 aB	7,89±1,19 aA	6,11 a
<b>Média</b>	3,74 B	6,50 A	
Tratamento	N° Raiz		Média
	<i>V. planifolia</i>	<i>V. phaeantha</i>	
10°C	0,42±0,12 cA	0,71±0,13 cA	0,56 c
20°C	3,17±0,51 bB	5,75±0,54 bA	4,46 b
25°C	5,25±0,83 aB	8,17±0,73 aA	6,71 a
<b>Média</b>	2,94 B	4,88 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	4,22±0,86 aB	5,67±0,95 aA	4,94 a
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	0,11±0,08 bB	1,72±0,30 bA	0,92 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	4,00±0,82 aB	5,44±0,89 aA	4,72 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	3,44±0,78 aB	6,67±1,09 aA	5,06 a
<b>Média</b>	2,94 B	4,88 A	

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

Avaliações futura do material vegetal, mantido sob condições de conservação *in vitro*, serão importantes para confirmar a viabilidade dos explantes armazenados quando transferidos para cultivos de multiplicação e aclimatização *ex vitro*. De acordo com Tyagi *et al.* (2010), Chauhan *et al.* (2019), um problema que ainda está presente na conservação *in vitro* é a fidelidade clonal, visto que algumas espécies podem sofrer variações somaclonais devido ao estresse submetido, que podem promover mudanças morfofisiológicas, implicando na homogeneidade genética dos clones. Porém, de acordo

com Bautista-Aguilar *et al.* (2021), informações sobre a fidelidade genética dos clones mantidos em bancos de germoplasma *in vitro*, para espécies de *Vanilla*, ainda são limitadas.

### 3.1.2 Análise de clorofila e carotenoides de plantas de baunilha conservadas *in vitro*

A análise da quantidade de clorofilas A, B e carotenoides presentes em folhas das brotações de baunilha, oriundas do experimento de conservação anteriormente apresentado (crescimento lento sob diferentes temperaturas e carboidratos), pode ocorrer de estresse fisiológico.

De acordo com a análise dos dados obtidos, as brotações provenientes do meio de cultivo suplementado com sorbitol isolado (0 sacarose + 87,6 sorbitol) apresentaram menores quantidades de clorofilas A, B e carotenóides, pigmentos fotossintetizantes. Em contrapartida o tratamento com a combinação de 43,8 mM L<sup>-1</sup> de cada carboidrato (43,8 sacarose + 43,8 sorbitol) foi o melhor apresentando as maiores quantidades de pigmentos fotossintetizantes, indicando plantas saudáveis (Tabela 5). Apesar de não haver diferenças importantes na comparação das médias entre as temperaturas de 20 e 25°C, no tratamento com 43,8 mM L<sup>-1</sup> de cada carboidrato (43,8 sacarose + 43,8 sorbitol), as quantidades de pigmentos fotossintetizantes presentes nas brotações cultivadas sob 25°C, após 12 meses de cultivo, são menores do que em brotações cultivadas sob 20 °C. Isso pode ser explicado por ser a temperatura que proporcionou melhor desenvolvimento das brotações, chegando a ocupar todo o espaço do tubo de ensaio e consumir o meio de cultura quase por completo, fazendo com que as mudas entrassem em senescência primeiro que as mudas mantidas sob 20°C. Assim, para conservação *in vitro* das espécies de baunilhas estudadas, por, até 12 meses, a o cultivo sob 20°C é o mais indicado por manter a qualidade fisiológica das plantas.

Quando as análises são feitas levando o genótipo em consideração, não foram verificadas diferenças significativas nos valores para as duas espécies, independente da temperatura e tipo de carboidrato (Tabela 6).



**Tabela 5.** Quantidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila A, clorofila B e carotenoides presente em folhas de brotações de espécies de baunilha, *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews, conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

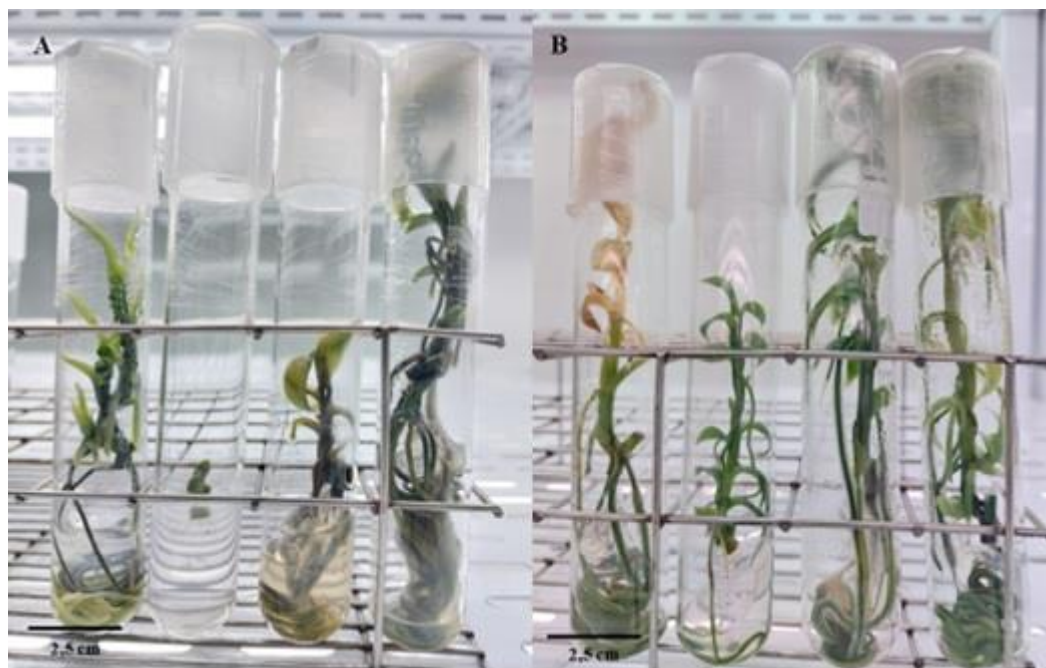
Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	Clorofila A ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	-	23,54±6,80 aA	10,93±5,77 aA	17,24 ab
0 sac + 87,6 sor	-	4,20±3,02 bA	11,20±3,59 aA	7,70 b
43,8 sac + 43,8 sor	-	28,28±3,10 aA	13,07±3,50 aB	20,68 a
87,6 sac + 87,6 sor	-	16,95±5,51 abA	10,46±4,33 aA	13,70 ab
<b>Média</b>	-	18,25 A	11,42 A	
Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	Clorofila B ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	-	7,83±2,70 abA	4,08±1,82 aA	5,30 ab
0 sac + 87,6 sor	-	1,58±1,06 bA	3,96±1,27 aA	2,77 b
43,8 sac + 43,8 sor	-	9,57±0,68 aA	5,37±1,26 aA	7,47 a
87,6 sac + 87,6 sor	-	6,78±2,02 abA	4,57±1,70 aA	5,67 ab
<b>Média</b>	-	6,11 A	4,50 A	
Tratamento (mM L <sup>-1</sup> )	Carotenoides ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Média
	10°C	20°C	25°C	
87,6 sac + 0 sor	-	191,87±55,40 aA	89,00±47,02 aA	140,44 ab
0 sac + 87,6 sor	-	34,27±24,58 bA	91,29±29,26 aA	62,78 b
43,8 sac + 43,8 sor	-	230,53±25,25 aA	106,52±28,55 aB	168,52 a
87,6 sac + 87,6 sor	-	138,08±44,93 abA	85,20±35,26 aA	111,64 ab
<b>Média</b>	-	148,69 A	93,00 A	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, e letras maiúsculas entre as temperaturas, pelo teste de Tukey a 5% de significância. ± Erro padrão.

**Tabela 6.** Quantidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila A, clorofila B e carotenoides presente em folhas de brotações de espécies de baunilha, *Vanilla phaeantha* Rchb. f. e *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews, conservadas *in vitro*, após 12 meses, sob diferentes temperaturas e em meio de cultivo suplementado com sacarose (sac) e/ou sorbitol (sor).

Tratamento	Clorofila A ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Média
	<i>V. phaeantha</i>	<i>V. planifolia</i>	
10°C	-	-	-
20°C	20,08±3,72 aA	16,41±4,70 aA	18,25 a
25°C	11,02±2,04 aA	11,81±3,68 aA	11,42 a
<b>Média</b>	15,55 A	14,11 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	16,02 ±7,33 aA	18,45±6,41 abA	17,24 ab
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	12,68±3,09 aA	2,73±2,73 bB	7,70 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	19,99±4,26 aA	21,37±5,16 aA	20,68 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	13,52±2,75 aA	13,89±6,77 abA	13,70 ab
<b>Média</b>	15,55 A	14,11 A	
Tratamento	Clorofila B ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Média
	<i>V. phaeantha</i>	<i>V. planifolia</i>	
10°C	-	-	-
20°C	7,22±1,21 aA	5,46±1,70 aA	6,11 a
25°C	4,40±0,65 aA	4,59±1,33 aA	4,50 a
<b>Média</b>	5,81 A	4,80 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	6,12±2,42 aA	5,38±2,30 abA	5,30 ab
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	4,51±1,02 aA	1,03±1,03 bB	2,77 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	7,05±1,18 aA	7,89±1,53 aA	7,47 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	5,56±0,94 aA	5,78±2,56 abA	5,67 ab
<b>Média</b>	5,81 A	4,80 A	
Tratamento	Carotenoides ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Média
	<i>V. phaeantha</i>	<i>V. planifolia</i>	
10°C	-	-	-
20°C	163,66±30,31 aA	133,71±38,33 aA	148,69 a
25°C	89,79±16,59 aA	96,22±29,99 aA	93,00 a
<b>Média</b>	126,73 A	114,97 A	
<b>87,6 sac + 0 sor</b>	130,53±59,76 aA	150,34±52,23 abA	140,44 ab
<b>0 sac + 87,6 sor</b>	103,31±25,16 aA	22,25±22,25 bB	62,78 b
<b>43,8 sac + 43,8 sor</b>	162,95±34,77 aA	174,11±42,07 aA	168,53 a
<b>87,6 sac + 87,6 sor</b>	110,12±22,38 aA	113,16±55,14 abA	111,64 ab
<b>Média</b>	126,73 A	114,97 A	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, e letras maiúsculas entre as temperaturas, pelo teste de Tukey a 5% de significância. ± Erro padrão.



**Figura 2.** Aspecto de brotações de *Vanilla phaeantha* Rchb. f. *in vitro* após 12 meses de cultivo sob influência de diferentes temperaturas e carboidratos. A – Temperatura de 20°C. B – Temperatura de 25°C. Escala: A e B – 2,5 cm.



**Figura 3.** Aspecto de brotações de *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews *in vitro* após 12 meses de cultivo sob influência de diferentes temperaturas e carboidratos. A – Temperatura de 20°C. B – Temperatura de 25°C. Escala: A e B – 2,5 cm.

#### 4 CONCLUSÕES

Conclui-se que a combinação de 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sacarose com 43,8 mM L<sup>-1</sup> de sorbitol e cultivo sob 20°C são as melhores condições para conservar espécies de baunilha (*Vanilla phaeantha* e *Vanilla planifolia*) *in vitro*, por, até 12 meses, proporcionando crescimento lento das brotações sem detrimento da capacidade fotossintética.

Ressalta-se que ainda são necessários estudos quanto ao tempo máximo em que as brotações suportam em meio de cultivo e temperatura, de conservação, sem comprometimento da sua capacidade fotossintética e vitalidade, além da avaliação de fidelidade genética, analisando eventuais variações somaclonais após o período em conservação.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUTISTA-AGUILAR, J. R.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J.; RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; ORTIZ-GARCÍA, M. M. (2021). In vitro Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. **HortScience**, v. 56, n. 12, p. 1494-1498.
- BORY, S.; GRISONI, M.; DUVAL, M. F.; BESSE, P. (2008) Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 55, p. 551-571.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, v. 1, p. 183-260.
- CHAUHAN, R.; SINGH, V.; QURAIISHI, A. (2019) In vitro Conservation Through Slow-Growth Storage. In: FAISAL, M.; ALATAR, A. (eds) Synthetic Seeds. **Springer**, p. 397-416.
- CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. (2007) Minimal Growth in vitro Culture for Preservation of Plant Species. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 13-25.
- CORDEIRO, S. Z.; SIMAS, N. K.; HENRIQUES, A. B.; SATO, A. (2014) In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 50, p. 326-336.
- CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. (2013) **Biotechnology and conservation of plant biodiversity Resources**, v.2, n. 2, p. 73–95.
- DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. (2006) Conservation of Vanilla species, in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 175-180.
- ENGELMANN, F. (1991) In vitro conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243.
- ENGELMANN F. (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. v. 40, n. 5, p. 427-433.
- GEORGE, F. E. (1993) The components of culture media. In GEORGE, F. E. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**, p. 273-343.
- JAIN, R. K.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C.; WU, R. (1997) Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 751-758.

- KAPAI, V. Y.; KAPOOR, P.; RAO, I. U. (2010) In vitro propagation for conservation of rare and threatened plants of India – A review. **International Journal of Biological Technology**. v.1, n. 2, p.1-14.
- KENDON, J. P.; RAJAOVELONA, L.; SANDFORD, H.; FANG, R.; BELL, J.; SARASAN, V. (2017) Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: ‘in vitro collecting’ as a case study. **Botanical Studies**, v. 58, n. 34, p. 1–14.
- LE MOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. (2002) Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364.
- LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. (2011) Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1354-1361.
- LIMA, A. P. P. S.; BASTOS, F. J. O.; LIMA-BRITO, A.; FERNANDES, G. B.; SANTANA, J. R. F. (2021) Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4, p. 763-771.
- MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. (2010) Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Caracterização *in vitro*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Documento 318.
- NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. (2010) Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG, Arca. p. 59-88.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 52, n. 2, p. 154-160.
- RODRIGUES, P. H. V.; ARRUDA F.; FORTI, V. A. (2018) Slow-grown in vitro conservation of *Heliconia champneiana* cv. Splash under different light spectra. **Scientia Agricola**. v. 75, n. 2, p.163-166.
- SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. (2002) Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos. **Instituto Nacional de Investigação Agrária**, p. 207.
- SIEFERMANN-HARMS, D. (1987). The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 3, p. 561-568.

- SILVA, N. D. G.; DUTRA, L. F.; BIANCHI, V. J.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. (2016) In vitro conservation of blackberry: Slow growth. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v.12, n. 1, p. 7-12.
- SOTO ARENAS, M. A. (1999) Filogeografía y recursos genéticos de las vanillas de México. **Informe final SNIB-CONABIO**, Instituto Chinoín AC., Yucatán.
- THAKUR, S.; TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K. (2015) In vitro approaches for conservation of *Asparagus racemosus* Willd. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.51, p.619-625.
- TREJGELL, A.; KAMINSKA, M.; TRETYN, A. (2015) In vitro slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 234.
- TYAGI, P.; KHANDUJA, S.; KOTHARI, S. (2010) In vitro culture of *Capparis decidua* and assessment of clonal fidelity of the regenerated plants. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 126-130.
- VEIGA, R. F. A. (2006) A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agronômico (IAC). **O Agrônomo**. v. 58, n. 1-2, p. 19-21.
- VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. (1991) The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 197-215.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C. *et al.* (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CBPH, p. 297-330.

## ANEXO I

### **New approaches for enhancing in vitro propagation of vanilla through the use of double-phase technique and temporary immersion bioreactor systems**

Mariana Oliveira Medeiros<sup>1</sup>, Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso<sup>2</sup>, Frederico Henrique da Silva Costa<sup>3</sup>, Paulo Roberto Martins Queiroz<sup>4</sup>, Bárbara Eckstein<sup>4</sup>, André Luís Xavier de Souza<sup>4</sup>, Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>2</sup> CNPq/Embrapa Postdoctoral Fellowship Program, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil

<sup>3</sup> Center for Biological and Natural Sciences, University of Acre, Rio Branco, AC, Brazil

<sup>4</sup> Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Parque Estação Biológica, PqEB, Brasília, DF 70770-917, Brazil

\*Corresponding author: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

[jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br)

#### **Abstract**

Vanilla is a plant of the genus *Vanilla* belonging to Orchidaceae family. Micropropagation is an important tool for producing plantlets, especially considering that conventional vegetative methods are low-yielding and expensive, and it can compromise the donor plants of propagules. The study was conducted with the objective of introducing innovative in vitro propagation techniques for vanilla species (*Vanilla planifolia* and *V. phaeantha*). The primary focus of this research was to evaluate the effectiveness of the double-phase technique and the utilization of temporary immersion bioreactor systems on clonal multiplication. Additionally, the study aimed to identify optimal conditions for plantlets acclimatization. Moreover, due to the strong bacterial contamination observed at the beginning of the in vitro establishment, the study included the isolation, identification, and control of these bacteria occurring in the culture. The initial phase involved the in vitro establishment accessions, using explants obtained from mother plants in a greenhouse. To address endophytic contamination, the explants underwent a decontamination process. This process was based on the supplementation of sodium ampicillin to the culture medium at different concentrations (0, 250, and 500 mg L<sup>-1</sup>) for up to five subcultures. The bacteria present in the culture during the establishment phase were isolated and identified using the 16S rRNA sequence. The study also



encompassed an evaluation of clonal multiplication strategies, which included assessing the influence of different consistencies of culture media (liquid, double-phase, and semisolid), and the use of three temporary immersion bioreactor models (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup>, and BIT<sup>®</sup>). The resulting plantlets underwent acclimatization in a mixture of commercial substrate and coconut fiber with varying composition and were kept in a growth chamber before being transferred to a greenhouse. It was verified that the use of ampicillin sodium led to a significant reduction in bacterial contamination over five subcultures. Sequencing using the 16S rRNA gene enabled the identification of contaminant bacteria, including species of the genera *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Hesbaspirillum*, and *Methylobacterium*. When evaluating the medium's consistency, the double-phase method emerged as the superior alternative for species multiplication, yielding a greater number of shoots per explant ( $7.0 \pm 0.4$ ) compared to the semisolid medium ( $5.3 \pm 0.3$ ). Among the tested temporary immersion bioreactor models, RALM<sup>®</sup> outperformed RITA<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> in terms of the number of shoots formed per explant ( $8.2 \pm 0.3$ ;  $4.9 \pm 0.2$ , and  $1.2 \pm 0.1$ , respectively). The use of substrates composed of commercial substrate and coconut fiber, in any combination tested, proved to be effective, ensuring 100% survival of vanilla plantlets in greenhouse.

**Keywords:** Orchidaceae, *Vanilla planifolia*, *Vanilla phaeantha*, liquid medium, endophytic contamination, large-scale micropropagation.

## Introduction

*Vanilla* is a plant genus within the Orchidaceae family. The genus comprises approximately 121 species, with at least 40 species identified in Brazil. Some of these species face endangerment due to depletion of their natural habitats, primary in tropical regions of the Americas, particularly in Mexico (Divakaran et al. 2006; Re flora 2020; IUCN 2022; POWO 2023).

The fruit of *Vanilla* yields a chemical compound known as vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), widely employed across various industries such as food, pharmaceuticals, cosmetics, and therapeutic, for enhancing aromas and flavors (Homma et al. 2006; Lee-Espinosa et al. 2008; Oliveira et al. 2013; Koyyappurath et al. 2015; Ferrara 2019; Bramel and Frey 2021). *Vanilla planifolia*, originating from Mexico, is the most renowned and commercialized cultivated species today. It boasts a high vanillin content and was initially employed in the preparation of cocoa beverages before spreading throughout Europe and eventually reaching Madagascar, the world's largest producer (Grisoni and Nany 2021). On the other hand, *Vanilla phaeantha* is also considered an aromatic species, characterized by its

elevated vanillin content, and is of substantial commercial interest (Li et al. 2020). This species is native to Brazil, where it was originally described as *V. bahiana* Hoehne, later considered as a synonym of *V. phaeantha*, which is found in other countries throughout the Americas (Karremans et al. 2020).

Numerous research endeavors have been undertaken to advance our understanding of these vanilla species while simultaneously enhancing methods for their cultivation, propagation, and biodiversity preservation (Koyyapurath et al. 2015; Nascimento et al. 2019). Despite Brazil's favorable conditions for vanilla cultivation, conventional propagation techniques, particularly through cuttings, suffer from low efficiency and high costs. Moreover, this method inflicts damage on the parent plants, exhibits slow propagation rates, and fails to meet the demands of the market (Gantait and Kundu 2017).

Micropropagation offers a promising avenue for achieving large-scale production using minimal source material, derived from tissues and organs of parent plants, thereby maintaining the genetic integrity of the propagated material (Lobertant and Altman 2010; Nogueira et al. 2017; Oseni et al. 2018). It further yields uniform, pathogen-free plantlets while reducing both time and space requirements (Scherwinski-Pereira and Fortes 2003; Oliveira et al. 2013). Research demonstrates the potential benefits of employing a double-phase medium in augmenting the multiplication and elongation rates of plantlets, as liquid medium provides enhanced nutrient accessibility to explants during cultivation (Scherwinski-Pereira and Fortes 2003; Scherwinski-Pereira et al. 2012; Oliveira et al. 2013; Siqueira et al. 2013). Bioreactor systems have also emerged as valuable tools to optimize the micropropagation process. These systems can operate with temporary or permanent immersion methods for propagation plant material on a large scale (Teixeira 2006; Dutra et al. 2009). Notably, the existing literature on vanilla micropropagation remains relatively scarce. The available reports predominantly focus on *Vanilla planifolia*, with limited insights into the *in vitro* cultivation of other species, as those native to the Brazilian territory, such as *V. phaeantha*.

In this context, the study was undertaken with the primary objective of introducing novel techniques for the *in vitro* propagation of vanilla species. The central focus was on the implementation of double-phase medium and temporary immersion systems. Furthermore, the research aimed to identify and manage endophytic bacteria during the initial stages of cultivation. It also assessed the impact of flask type on multiplication rates, in addition to determining the ideal conditions for the acclimatization of cloned plantlets.

## Materials and Methods

### *Plant material*

The plant materials used in this study were obtained from mother plants of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. and from the in vitro collection of *Vanilla planifolia* Jack ex. Andrews, both sourced from the Germplasm Bank at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil. The *V. phaeantha* accessions (LBB and DBS647) were acquired by researchers from regions within the Brazilian Cerrado, specifically from the states of the Federal District and Minas Gerais. As for the *V. planifolia*, accessions, they were collected in the Turrialba region of Costa Rica, and duplicate samples were subsequently deposited in the Germplasm Bank at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology.

### *In vitro establishment of vanilla*

The cuttings of *V. phaeantha* underwent a thorough cleaning process, involving a preliminary rinse under running water along with the use of a neutral detergent to remove visible contaminants like substrate and insects. Subsequently, these cuttings were carefully divided into stem segments (nodals) measuring approximately 1.0 cm in height, each having at least one axillary bud. For sterilization, the nodal segments were handled within a laminar flow chamber. They were first immersed in a 70% ethanol (v/v) solution for 5 minutes. Following this, the segments were immersed in a 5% active chlorine solution of sodium hypochlorite (NaOCl) for 25 minutes. Finally, the explants underwent a thorough rinsing process, with three successive 5-minute washes using distilled and autoclaved water.

Once disinfested, the explants were transferred to a basic Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962), which was supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) and 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel (Sigma, St. Louis, MO, USA). The pH of the medium was adjusted to 5.7 ± 0.1 before autoclaving, a process carried out for 20 minutes under 1.3 atm of pressure at 121 °C.

The cultivation conditions for the explants were maintained at 25 ± 2°C, with a photoperiod of 16 hours and a light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. During this phase, the explants were cultured for 30 days and subjected to regular assessment for fungal and bacterial contamination, recorded as a percentage, at intervals of 7, 15, and 30 days. A total of 24 repetitions for the LBB accession and 14 repetitions for the DBS647 accession were evaluated. Each repetition involved a test tube (25 x 150 mm) containing 10 ml of medium with one shoot per tube.

### *Elimination of endophytic bacteria*

Initially, the elimination of endophytic bacteria was conducted using the broad-spectrum antibiotic, Ampicillin Sodium (Sigma, A0166-5G), in conjunction with explants from the LBB accession of *Vanilla phaeantha*. The inoculation of explants took place in a Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel. Three different concentrations of ampicillin sodium were introduced into the culture medium: 0 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, and 500 mg L<sup>-1</sup>, incorporated via cold sterilization (0.22 μm). Prior to autoclaving, the medium's pH was adjusted to 5.7 ± 0.1. Autoclaving was performed for 20 minutes under 1.3 atm of pressure at 121 °C. Explants were maintained for a period of 30 days under controlled conditions, which included a temperature of 25 ± 2°C, a photoperiod of 16 hours, and light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Throughout the 30-day cultivation period, the explants were examined for bacterial contamination at intervals of 7, 15, and 30 days, with contamination levels expressed as a percentage. Additionally, developmental assessments were conducted, evaluating the presence of roots, the emergence of new shoots, and the extent of explant oxidation. Each treatment was repeated ten times, with each repetition consisting of a test tube (25 x 150 mm) containing 10 ml of medium and one shoot per tube.

Once the best ampicillin sodium concentration has been determined, explants from two accessions of *V. phaeantha*, LBB and DBS647, which exhibited bacterial contamination and growth issues upon establishment, underwent a decontamination process with ampicillin sodium. Five consecutive subcultures, each lasting 30 days, were carried out in MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel, and 500 mg L<sup>-1</sup> of ampicillin sodium (the concentration determined as optimal through phytotoxicity testing). Additionally, a sixth subculture was conducted in MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel, omitting the addition of Ampicillin Sodium. The pH of the media was adjusted to 5.7 ± 0.1 before autoclaving, which was performed for 20 minutes, under 1.3 atm of pressure and 121 °C. The conditions of the explant cultivation were 25 ± 2°C, a photoperiod of 16 hours, and light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

At each subculture stage, samples were obtained from stems, characterized as discs measuring 1 to 3 mm in diameter. These discs were inoculated in Nutrient Agar (NA) medium (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brazil), placed in Petri dishes (90 x 15 mm) with 20 mL of medium per plate, to facilitate bacterial growth. Visual inspections and NA analyses, expressed

in percentages, were conducted at 7, 15, and 30-day intervals during each subculture cycles to assess decontamination process.

In addition to contamination analysis, evaluations were performed to assess explant development and multiplication. Developmental assessments were based on the arithmetic means of shoot heights, while multiplication rate was calculated as the arithmetic mean of the number of buds formed by each explant in each subculture. The cumulative multiplication rate was determined by the number of shoots generated in each subsequent subculture. In this experiment, each replicate consisted of a test tube (25 x 150 mm) containing 10 mL of medium with one shoot per tube.

#### *Identification of endophytic bacteria*

The investigation to identify endophytic bacteria was conducted in collaboration with the Laboratory of Entomopathogenic Bacteria at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil. To pinpoint the presence of endophytic bacteria within the explants of *V. phaeantha*, samples were extracted from colonies that had developed during the *in vitro* establishment of the species. These samples were then cultured in Kado and Heskett nutrient medium (KH, 1970) at a temperature of  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  for a duration of 24 hours. Following this incubation period, the bacteria were purified and stored in 1.5 mL Eppendorf tubes containing distilled and autoclaved water. This storage was carried out in a refrigerated environment for subsequent use. Furthermore, a Gram Reaction Test using 3% potassium hydroxide (KOH) was conducted to differentiate between gram-positive and gram-negative bacteria.

For genetic analysis, bacterial DNA was extracted following the protocol described by (Marmur 1961). Polymerase Chain Reaction (PCR) was then performed using 16S rRNA primers (Weisburg et al., 1991) to enable subsequent genetic sequencing and identification of the endophytic bacteria at the genus level. The PCR samples were dispatched to Macrogen, Inc. (Seoul, Korea), a biotechnology company, for genetic sequencing. Subsequently, the genetic sequences were imported into Geneious Prime, a software tool designed for the analysis of molecular and genetic sequence data. These sequences were then matched with previously identified sequences available in GenBank, a nucleotide sequence database maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI). This comprehensive procedure allowed for the precise identification of endophytic bacteria present within the *V. phaeantha* explants, enhancing our understanding of the microbial communities associated with this plant species.

### *Multiplication of vanilla shoots in different culture medium consistencies*

The experiment was conducted based on the protocol established by Oliveira et al. (2013). Nodal stem explants, approximately 1.0 cm in height and possessing at least one lateral bud, were utilized. These explants were sourced from two vanilla species: *V. planifolia* (accession 5) and *V. phaeantha* (accession LBB), both of which are available in the Germplasm Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil.

For the liquid culture medium and the liquid phase of double-phase medium, it was employed MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP). In contrast, 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel was added to the semisolid culture medium and the semisolid phase of the double-phase medium. Prio to autoclaving, the pH of the media was adjusted to 5.7 ± 0.1. Autoclaving was carried out for 20 minutes at 121 °C and 1.3 atm of pressure. Cultivation conditions for the explants included maintaining a temperature of 25 ± 2°C, a photoperiod of 16 hours, and a light intensity of 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

The experiment setup involved glass flasks (65 x 110 mm) containing 30 mL of medium for both semisolid and liquid culture media. In the case of the double-phase medium, 20 mL of semisolid medium was overlaid with 10 mL of liquid medium. Every 30 days, the semisolid medium treatment remained unchanged, an additional 10 mL of liquid medium was added to the double-phase medium, and for the liquid medium, a partial renewal of 15 mL was executed. Each accession was represented by five replicates, with each replicate comprising three glass flasks, and five explants were placed in each flask. The treatments were assessed every 30 days over a period of 90 days, with a focus on determining the number of new shoots per explant.

After 90 days of cultivation, the newly formed shoots were isolated and transferred to test tubes (25 x 150 mm), each containing 10 mL of MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel for the purpose of regeneration. For each accession, five replicates were utilized, with each replicate consisting of five test tubes (25 x 150 mm), each containing one shoot. Regeneration analyses were conducted every 30 days for a duration of 60 days, during wich shoot height and the presence of root were evaluated.

### *Multiplication of vanilla in different bioreactor models*

In this experiment, three different types of temporary immersion bioreactors, named RITA<sup>®</sup> (1 L), RALM<sup>®</sup> (5 L), and BIT<sup>®</sup> (5 L), were employed to evaluate their efficiency with the *V. phaeantha* access LBB (Fig. 1). Nodal stems explants, measuring approximately 1.0 cm in height and possessing an axillary bud, were used for this study. MS medium supplemented

with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP) was used as the culture medium.

For the RITA<sup>®</sup> bioreactor model, 180 mL of liquid medium was allocated for every 6 explants. In contrast, for both RALM<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> bioreactor models, 750 mL of liquid medium was used for every 25 explants. This ensured a consistent nutrient proportion of 30 mL of culture medium per explant. Additionally, explants were cultivated in flasks containing a semisolid medium of the same composition (serving as the control), which included a Phytigel gelling agent (2.3 g L<sup>-1</sup>). In the case of flasks, 90 mL of semisolid medium was dispensed for every three explants.

Each treatment consisted of nine replicates for flask, 18 replicates for the RITA<sup>®</sup> bioreactor, and 75 replicates for both RALM<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> bioreactor models. Each replicate was represented by a single explant. To ensure uniformity and to address the initial disproportionality in the culture medium volume, cultivation conditions were standardized: 30 mL of culture medium per explant, a temperature maintained at 25 ± 2°C, a photoperiod of 16 hours, and a light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Analyses were conducted after 90 days' cultivation to assess the number of new shoots formed by each explant.

Following 90 days of cultivation, the newly formed shoots were separated and placed in MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel for regeneration. A total of 30 replicates were established for each treatment, with each replicate consisting of a single shoot. Regeneration analysis was conducted after 30 days of cultivation, focusing on shoot survival and the presence of roots.

#### *Rooting and acclimatization of vanilla plantlets*

Upon achieving a favorable rooting rate in the basic medium, shoots from the LBB *V. phaeantha* access were transferred to MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel. In this phase of the experiment, various substrates and combinations thereof were tested.

In vitro-growth plants, with aerial heights ranging from 8 to 10 cm, were transplanted into 300 mL plastic cups (measuring 10 x 7.5 cm) containing 150 mL of substrate, moistened with approximately 50 mL of water (pre-drilled in the bottom for excess water drainage). These plants were maintained in a Refrigerated Biological Incubator (Percival-35LLVL, Boone, Iowa), a growth chamber, at a temperature of 25 ± 2°C, a photoperiod of 16 hours, and light intensity of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for a duration of 30 days.

The experiment design included 10 replicates for each treatment, with treatments consisting of different substrates, namely commercial substrate (CS) (Maxfétil Fertilizantes®, Pouso Redondo, Brazil) and coconut fiber (CF) (Golden mix®, Amafibra, Ananindeua, Brazil), either individually or in various combinations. The treatments were as follow: T1 – 150 mL<sup>3</sup> of CS, T2 – 150 mL<sup>3</sup> of CF, T3 – 75 mL<sup>3</sup> of CS plus 75 mL<sup>3</sup> of CF, T4 – 100 mL<sup>3</sup> of CS plus 50 mL<sup>3</sup> of CF, T5 – 112.5 mL<sup>3</sup> of CS plus 37.5 mL<sup>3</sup> of CF, T6 – 50 mL<sup>3</sup> of CS plus 100 mL<sup>3</sup> of CF, and T7 – 37.5 mL<sup>3</sup> of CS plus 112.5 mL<sup>3</sup> of CF.

To gradually acclimatize the plants to natural conditions, a plastic cup was used to cover the aerial parts of the plantlets during initial 15 days after planting, preventing gas exchange. At 21 days, the cup was perforated to allow gas exchange, and at 30 days, the cup was entirely removed, exposing the plantlets to natural conditions in the greenhouse. After 30 days of cultivation in natural conditions, the survival rates and heights of the plantlets were evaluated.

#### *Statistical analysis*

In all experiments, a completely randomized design was employed. The data underwent analysis of variance (ANOVA), and means comparisons were conducted using Tukey test at a 5% significant level, utilizing the Sisvar Statistical software (Ferreira, 2011). Data that exhibited non-normal distribution, as determined by the Shapiro-Wilk test, were subjected to prior transformations. Numerical data were transformed using  $\sqrt{x + 0.5}$ , while percentage data were transformed using the arc-sine  $\sqrt{x \div 100}$ .

## **Results and Discussion**

### *In vitro establishment of vanilla*

Both accessions exhibited a pronounced contamination rate, with the LBB accessions displayed 100% bacterial contamination within the initial week of cultivation (Fig. 2). Furthermore, in addition to bacterial contamination, fungal contaminations were also observed in the explants (Table 1).

### *Elimination of endophytic bacteria*

In the phytotoxicity test, the control treatment (0 mg L<sup>-1</sup> of ampicillin sodium) exhibited 100% bacterial contamination within the initial 7 days of cultivation, along with the expected fungal contamination, as observed during the initial establishment phase. The ampicillin sodium treatments at concentrations of 250 mg L<sup>-1</sup> and 500 mg L<sup>-1</sup> resulted in reduced bacterial



contamination rates of 90% and 50%, respectively. Notably, explants in the control treatment (0 mg L<sup>-1</sup>) displayed limited development due to the high contamination rate. Conversely, treatments with 250 mg L<sup>-1</sup> and 500 mg L<sup>-1</sup> showed improved explant development. The concentration of 500 mg L<sup>-1</sup> proved to be particularly effective for explant development, even slightly surpassing the results obtained with the 250 mg L<sup>-1</sup> concentration for the formation of young shoots (50%). Due to this superior performance and the lower contamination rate, the treatment involving 500 mg L<sup>-1</sup> of ampicillin sodium was selected to initiate the process of cleaning established explants contaminated with bacteria. Previous studies have demonstrated the utility of ampicillin sodium, a broad-spectrum antibiotic belonging to the aminopenicillin group, in the in vitro clonal cleaning of various plant species, including *Musa sapientum* L. (Habiba et al. 2002), *Fraxinus* spp. (Donnarumma et al. 2011), *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Jena and Samal 2011), and *Musa × paradisiaca* L. (El-Banna et al. 2021).

Upon completing the fifth subculture during the cleaning phase, visual analysis revealed a bacterial contamination rate of 0.7% for the LBB accession and 6.9% for the DBS647 accession (Table 2). Nutrient agar analysis indicated 0% contamination for the LBB accession in the first week, with this low level persisting in subsequent weeks. Conversely, the DBS647 accession exhibited 6.9% contamination at the end of the period. After 30 days of explant being maintained in a medium without antibiotics, the LBB accession displayed 0.1% visual bacterial contamination, while the DBS647 accession exhibited 3.0%. Nutrient agar results indicated 0% contamination for LBB accession, whereas the DBS647 accession had 2.0% contamination (Fig. 3).

The results suggest that some explants from DBS647 accession still harbored bacterial contamination, although in a smaller quantity compared to the initial establishment. In contrast, for the LBB accession, both visual and nutrient agar analyses confirmed the complete elimination of endophytic bacteria after five subcultures, demonstrating the efficacy of ampicillin sodium in the clonal cleaning of the species. However, the persistence of endogenous bacteria in the DBS647 accession may be due to the ineffectiveness of ampicillin sodium against certain bacteria in this accession. The use of antibiotics is associated with limitations, including high cost, reduced efficacy against specific bacterial strains, sensitivity to temperature, phytotoxicity, and ineffectiveness against fungi (Arab et al. 2014; Spinoso-Castillo et al. 2017). Therefore, it is crucial to conduct further research to identify these endophytic bacteria to enable targeted use of specific and bactericidal substances.

The height of the shoots can influence the number of buds formed and, in most cases, the rate of clonal multiplication. Over the course of six subcultures, the LBB accession achieved

a cumulative multiplication rate of 274 new shoots, while the DBS647 accession reached 202 new shoots, from initial 3 and 4 shoots, respectively. This results underscore the potential of in vitro culture, affirming its capacity to propagate and rapidly multiply clones (Fig. 4).

#### *Identification of endophytic bacteria*

Following the isolation and purification of bacteria from the in vitro establishment of *V. phaeantha* (Fig. 5), morphological characterization of the colonies and the Gram reaction test were conducted to differentiate them into gram-negative or gram-positive bacteria. This differentiation was achieved by assessing the response to a 3% KOH solution, which provided insight into the resistance of the bacterial cell wall. Among these microorganisms, there exists a diverse group of both gram-positive and gram-negative bacteria known to inhabit the soil and various plant parts, particularly the rhizosphere. These bacteria play vital roles in promoting vegetative growth, conferring tolerance to abiotic and biotic stresses, aiding in nutrient uptake, enhancing plant defense mechanisms, and potentially fixing atmospheric nitrogen (Valenzuela-Aragón et al. 2019; Rojas-Padilla et al. 2020; Cruz-Cárdenas et al. 2021). Out of the six bacterial DNA samples submitted for sequencing, three were identified as belonging to known genera, while the other three could not be matched to any sequences available in existing database. According to Drancourt et al. (2004) and Stackebrandt and Ebers (2006), for strains to be classified within the same species, the level of genetic identity should exceed 98.7%, and for them to be attributed to a particular genus, the identity must surpass 97%. Unfortunately, none of the samples achieved an identity score of 97% or higher (Table 3), making it impossible to definitively confirm their identity. However, it is reasonable to propose genera, based on sequencing using the 16S rRNA gene.

Among the closely related genera, two are known to be phytopathogenic, capable of causing disease (*Agrobacterium* sp. and *Herbaspirillum* sp.) (Baldani et al. 1997). Nonetheless, these bacteria can be considered when they function as atmospheric nitrogen fixers. Djordjevic et al. (1987) have noted that many phytopathogens have evolved to become compatible with their host plants, causing less harm and even providing certain benefits. The third genetically related genus, *Methylobacterium* sp., is characterized as an endophytic bacterium that can inhabit various parts of the plant. It may be involved in nitrogen fixation, phytohormone production, and interactions with pathogens, ultimately promoting plant growth and enhancing photosynthetic activity (Sy et al. 2001; Araujo et al. 2002; Cervantes-Martínez et al. 2004; Madhaiyan et al. 2006; Menna et al. 2006; Meena et al. 2012; Dourado et al. 2015; Quambusch and Winkelmann 2018). Moreover, as highlighted by Quambusch and Winkelmann (2018), the

diverse effects exerted by endophytes on plants are contingent upon environmental conditions, host genotype, and the plant's developmental stage.

#### *Multiplication of vanilla shoots in different culture medium consistencies*

Both species exhibited robust development in semisolid and double-phase medium, producing multiple shoots per explant (Fig. 6). In contrast, the liquid medium yielded inferior results, characterized by the absence of bud development and an achlorophyllous, hyperhydric appearance. This is in contrast to findings by George and Ravishankar (1997) and Manokari et al. (2021), who reported higher multiplication rates for *V. planifolia* in liquid medium.

On average, the double-phase medium resulted in more shoots per explant ( $7.2 \pm 0.5$  for *V. planifolia* and  $6.8 \pm 0.3$  for *V. phaeantha*), compared to the semisolid medium ( $5.7 \pm 0.2$  for *V. planifolia* and  $4.8 \pm 0.3$  for *V. phaeantha*) (Table 4). Thus, under the study conditions, the double-phase medium emerged as the most suitable option for the multiplication of *Vanilla* species. These findings align with those reported by Oliveira et al. (2013) when working with *V. planifolia*. This culture medium system has also demonstrated success in the in vitro culture of various other plant species, including *Pyrus pyrifolia* (Kadota et al. 2001), *Malus prunifolia* (Machado et al. 2004), *Pinus taeda* (Pullman and Skryabina 2007), *Ananas comosus* (Scherwinski-Pereira et al. 2012), as well *Rauwolfia serpentine* (Senapati 2015). It offers advantages such as increased shoot multiplication rates in in vitro culture (Moraes et al. 2004; Machado et al. 2004) and promoting enhanced growth of regenerated shoots (Martínez et al. 2012).

#### *Multiplication of vanilla shoots in different bioreactors models*

In this experiment, various models of temporary immersion systems (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup>, and BIT<sup>®</sup>) were evaluated, alongside the conventional (control) in vitro culture system. The presence of BAP in the medium provided the formation of multiple shoots per explant. Regarding the variable formation of new shoots per explant, the RALM<sup>®</sup> model demonstrated the most favorable outcome ( $8.2 \pm 0.3$ ) (Fig. 7), followed by the RITA<sup>®</sup> model and the traditional system, with no significant differences observed between them ( $4.9 \pm 0.2$  and  $4.3 \pm 0.6$ , respectively). However, the BIT<sup>®</sup> model did not produce satisfactory results for shoot formation ( $1.2 \pm 0.1$ ), resulting in achlorophyllous shoots with hyperhydric appearance (Table 5). These results differ from those reported by Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu (2016), who found that the BIT<sup>®</sup> model outperformed RITA<sup>®</sup> in the production of *V. planifolia* shoots. The BIT<sup>®</sup> model has also demonstrated efficiency in biomass and shoot elongation from

medicinal plant species, as reported by De Carlo et al. (2021). Nevertheless, our findings align with those presented by Ramos-Castellá et al. (2014), who reported the highest efficiency of the RITA<sup>®</sup> model in vanilla (*V. planifolia*) multiplication. It is worth noting that this work is the first to report results using the RALM<sup>®</sup> bioreactor mode in vanilla.

The failure of shoots development in the BIT<sup>®</sup> system can be attributed to several system shortcomings, including the reflux of medium from the storage container to the culture container, resulting in prolonged partial contact between explants and the liquid medium. Sreedhar et al. (2009) and Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu (2016) have noted that partial immersion of explants in a liquid medium can lead to hyperhydricity in *V. planifolia* shoots. Additionally, the system is prone to more frequent contamination due to difficulties in cleaning and sterilizing non-autoclavable materials. Given these limitations, future optimizations of this system are essential to maintain low production costs without compromising functionality

In the shoot elongation and rooting phase, the RALM<sup>®</sup> system also yield superior results ( $1.0 \pm 0.0$  and  $0.5 \pm 0.1$ , respectively), followed by the traditional system ( $0.6 \pm 0.1$ ), which outperformed the RITA<sup>®</sup> system ( $0.3 \pm 0.1$ ) (Table 5). The BIT<sup>®</sup> system, under the study conditions, proved ineffective for the elongation and rooting of *V. phaeantha*.

#### *Rooting and acclimatization of vanilla plantlets*

The species under investigation, *V. phaeantha*, demonstrates a rooting rate of approximately 99.3% (data not show) in a basic medium, obviating the need for auxin supplementation. Regarding the survival analysis, all treatments, with the exception of the coconut fiber treatment (CF, 50%), yielded a 100% survival rate (Table 6) (Fig. 8). The lower survival rate observed in the coconut fiber (CF) treatment can likely be attributed to the fact that this substrate is nutrient-poor, serving primarily as a moisture retention medium. This deficiency in nutrient may have also influenced the height of acclimatized plantlets, which exhibited lower average heights ( $4.6 \pm 1.5$ ) compared to other treatments. Consequently, using coconut fiber as a standalone substrate is not recommended for the cultivation of *V. phaeantha*.

#### **Conclusion**

In conclusion, clonal cleaning using  $500 \text{ mg L}^{-1}$  of ampicillin sodium has proven to be an effective method for significantly reducing bacterial contamination in *Vanilla phaeantha* explants. This approach represents an essential alternative for the successful in vitro establishment of the species. Additionally, the 16S rRNA primer sequencing revealed close

genus-level identities for the isolated vanilla bacteria. In the context of clonal multiplication, it is noteworthy that the double-phase medium exhibited superior performance under the specific study conditions, resulting in a significantly higher number of shoots produced per explant. Among the bioreactor models examined, the RALM<sup>®</sup> model emerged as particularly noteworthy, achieving a high rate of shoot multiplication, 100% elongation, and the formation of viable plants suitable for ex vitro cultivation. This makes the RALM<sup>®</sup> bioreactor an attractive option for mass-producing of vanilla species. Finally, it can be concluded that the use of substrates composed of parts of commercial substrate and coconut fiber has proven to be effective in ensuring high survival rates for vanilla plantlets.

**Author contributions** JES-P and MOM conceived and designed this study. MOM, IMAS-C, FHSC, PRMQ, BE and ALXS carried out, analyzed the experiments, and summarized the results. MOM, IMAS-C, and JES-P wrote the manuscript. JES-P revised and edited the manuscript.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding** This research was supported by Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply – MAPA, Brazil), TED 083/2020, and Embrapa 20.21.10.014.00.00.

**Data Availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### **Declarations**

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Human and animal rights statement** This research did not involve human participants and/or animals

#### **References**

Arab MM, Yadollahi M, Hosseini-Mazinani A, Bagheri S (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (a hybrid of almond × peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(2):103-110. DOI: 10.1016/j.jgeb.2014.10.002

Araújo W, Marcon J, Maccheroni W Jr, Elsas JDv, Vuurde JWLv, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4906-4914. DOI: 10.1128/aem.68.10.4906-4914.2002

Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Kimura O, Döbereiner J (1997) Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N<sub>2</sub> em associação com plantas. Seropédica: Embrapa-CNPAB, Documentos 41:25. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/624247>

Bramel P, Frey F (2021) Global strategy for the conservation and use of *Vanilla* genetic resources. Global Crop Diversity Trust, Germany. DOI: 10.5281/zenodo.7544770

Cervantes-Martínez J, López-Díaz S, Rodríguez-Garay B (2004) Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. *Plant Science*, 166(4):889-892. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.11.029

Cruz-Cárdenas CI, Molina LXZ, Cancino GS, Villalobos SS, Anaya ER, Díaz IFC, Ramírez SR (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5):899-913. DOI: 10.29312/remexca.v12i5.2905

De Carlo A, Tarraf W, Lambardi M, Benelli C (2021) Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants. *Agronomy*, 11(12):2414. DOI: 10.3390/agronomy11122414

Divakaran M, Babu KN, Peter KV (2006) Conservation of *Vanilla* species, in vitro. *Scientia Horticulturae*, 110(2):175-180. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.07.003

Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG (1987) *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. *Annual Reviews of Phytopathology*, 25:145-168. DOI: 10.1146/annurev.py.25.090187.001045

Donnarumma F, Capuana M, Vettori C, Petrini G, Giannini R, Indorato C, Mastromei G (2011) Isolation and characterization of bacterial colonies from seeds and in vitro cultures of *Fraxinus* spp. from Italian sites. *Plant Biology*, 13:169-176. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00334.x

Dourado MN, Neves AAC, Santos DS, Araújo WL (2015) Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International*. DOI: 10.1155/2015/909016

- Drancourt M, Berger P, Raoult D (2004) Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5):2197-2202. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2197-2202.2004
- El-Banna AN, El-Mahrouk ME, Dewir YH, Farid MA, Abou Elyazid DM, Schumacher HM (2021) Endophytic bacteria in banana in vitro cultures: molecular identification, antibiotic susceptibility, and plant survival. *Horticulturae*, 7(12):526. DOI: 10.3390/horticulturae7120526
- Ferrara L (2019) Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*: A narrative review. *International Journal of Medical Reviews*, 7(1):22-26. DOI: 10.30491/IJMR.2020.222917.1081
- Gantait S, Kundu S (2017) In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9):1-19. DOI: 10.1007/s11738-017-2462-1
- George PS, Ravishankar GA (1997) In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Reports*, 16:490-494. DOI: 10.1007/BF01092772
- Grisoni M, Nany F (2021) The beautiful hills: half a century of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) breeding in Madagascar. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68:1691-1708. DOI: 10.1007/s10722-021-01119-2
- Habiba U, Reza S, Saha ML, Khan MR, Hadiuzzaman S (2002) Endogenous Bacterial Contamination During In vitro Culture of Table Banana: Identification and Prevention. *Plant Tissue Culture*, 12(2):117-124. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85831177>
- Homma AKO, Menezes AJEA, Matos GB (2006) Cultivo de baunilha: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18943/1/Doc-254.pdf>
- IUCN (2022) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>
- Jena RC, Samal KC (2011) Endogenous microbial contamination during in vitro culture of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]: identification and prevention. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6):1725-1731. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/IJAT/10841193.pdf>

- Kadota M, Niimi Y (2002) In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Reports*, 21:282-286. DOI: 10.1007/s00299-002-0509-1
- Karremans AP, Chinchilla IF, Rojas-Alvarado G, Cedeño-Fonseca M, Damián A, Léotard G (2020) A reappraisal of neotropical *Vanilla*. With a note on taxonomic inflation and the importance of alpha taxonomy in biological studies. *Lankesteriana*, 20(3). DOI: 10.15517/lank.v20i3.45203
- Lee-Espinosa HE, Murguía-González J, García-Rosas B, Córdova-Contreras AL, Laguna-Cerda A, Mijangos-Cortés JO, Barahona-Pérez LF, Iglesias-Andreu LG, Santana-Buzzy N (2008) In vitro clonal propagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *Hortscience*, 43(2):454-458. DOI: 10.21273/HORTSCI.43.2.454
- Li J, Demesyieux L, Brym M, Chambers AH (2020) Development of species-specific molecular markers in *Vanilla* for seedling selection of hybrids. *Molecular Biology Reports*, 47:1905-1920. DOI: 10.1007/s11033-020-05287-9
- Loberant B, Altman A (2010) Micropropagation of plants. In: Flickinger MC (2010) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Copyright© John Wiley & Sons, Inc. DOI: 10.1002/9780470054581.eib442
- Machado MP, Carvalho CD, Biasi LA (2004) Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. *Scientia Agraria*, 5(1-2):69-72. DOI: 10.5380/rsa.v5i1.1099
- Madhaiyan M, Suresh Reddy BV, Anandham R, Senthilkumar M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Tongmin SA (2006) Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Current Microbiology*, 53:270-276. DOI: 10.1007/s00284-005-0452-9
- Manokari M, Priyadharshini S, Jogam P, Abhijit Dey, Shekhawat SM (2021) Meta-topolin and liquid medium mediated enhanced micropropagation via ex vitro rooting in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 146:69-82. DOI: 10.1007/s11240-021-02044-z
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms *J Mol Biol* 3:208-218. DOI 10.1016/S0022-2836(61)80047-8



- Martínez SF, Castillo CM, Casas JL (2012) In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*. Journal of Plant Biochemical and Biotechnology, 21:300-304. DOI: 10.1007/s13562-011-0102-1
- Meena KK, Kumar M, Kalyuzhnaya MG, Yandigeri MS, Singh DP, Saxena AK, Arora DK (2012) Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. Antonie van Leeuwenhoek, 101:777-786. DOI: 10.1007/s10482-011-9692-9
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martínez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. Systematic and Applied Microbiology, 29(4):315-332. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.12.002
- Moraes LKA, Felisbino C, Crestani L, Lima Da Silva A (2004) Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura "dupla-fase". Revista Brasileira de Fruticultura, 26:403-405. DOI: 10.1590/S0100-29452004000300008
- Nogueira JS, Costa FHS, Vale PAA, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2017) Micropropagação de bambu em larga-escala: princípios, estratégias e desafios. In: Drumond PM, Wiedeman G (Orgs). Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia. 1 ed. – Rio de Janeiro: ICH. 103-129. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170604/1/26392-105-131.pdf>
- Oliveira SOD, Sayd RM, Balzon TA, Scherwinski-Pereira JE (2013) A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. Scientia Horticulturae, 161:204-209. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.06.039
- Oseni OM, Pande V, Nailwal TK (2018) A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(7):3778-3786. DOI:10.20546/ijcmas.2018.707.438
- Reflora (2020) Orchidaceae in Flora and Funga of Brazil. Botanical Garden of Rio de Janeiro. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>
- POWO (2023). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org>
- Pullman GS, Skryabina A (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Reports, 26:873-887. DOI: 10.1007/s00299-006-0296-1

Quambusch M, Winkelmann T (2018) Bacterial endophytes in plant tissue culture: mode of action, detection, and control. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Nature, 1815:69-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4\_4

Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 52(2):154-160. DOI: 10.1007/s11627-015-9735-4

Ramos-Castellá A, Iglesias-Andreu LG, Bello-Bello J, Lee-Espinosa H (2014) Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 50:576-581. DOI: 10.1007/s11627-014-9602-8

Rojas Padilla J, Chaparro Encinas LA, Robles Montoya RI Santos Villalobos S (2020) Promoción de crecimiento en trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) por la co-inoculación de cepas nativas de *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México. *Nova scientia*, 12(24). DOI: 10.21640/ns.v12i24.2136

Scherwinski-Pereira JE, Fortes GRL (2003) Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:1035-1043. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000900003

Scherwinski-Pereira JE, Lima ECA, Da Silva TL, Mesquita AGG, Maciel AS, Costa FHS (2012) Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 109:263-269. DOI: 10.1007/s11240-011-0091-8

Senapati SK (2015) A Double Phase Culture System: An Economic and Time Saving Protocol for in vitro Propagation of Plant. *SAJ Biotechnology*, 2(1). DOI: 10.18875/2375-6713.1.301

Siqueira DL, Santos D, Salomão LCC, Silva FF, Barros ZJ (2013) Micropropagação de bananeira 'Maça', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. *Revista Ceres*, 60(6):745-751. DOI: 10.1590/S0034-737X2013000600001

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc Agrotecnol.* 35(6):1039–1042 <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex. Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 129:195-207. DOI: 10.1007/s11240-017-1169-8

Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009) Hyperhydricity related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). *Journal Plant Growth Regulation*, 28:46-57. DOI: 10.1007/s00344-008-9073-4

Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33:152-155.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 183(1):214-220. DOI: 10.1128/JB.183.1.214-220.2001

Valenzuela-Aragón B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, Santos-Villalobos S (2019) Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant Soil*, 435:367-384. DOI: 10.1007/s11104-018-03901-1

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991

**Table 1.** Fungal and bacterial contamination during the in vitro establishment of LBB and DBS647 accessions of *Vanilla phaeantha* Rchb. f.

Cultivation time (days)	Contamination (%)			
	Fungal (%)		Bacterial (%)	
	LBB	DBS647	LBB	DBS647
7	12.5	7.1	100.0	78.6
15	29.2	21.4	100.0	85.7
30	33.3	28.6	100.0	85.7

**Table 2.** Bacterial contamination (visual and in Nutrient Agar) in accesses of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB and DBS647, after up to five subcultures with 500 mg L<sup>-1</sup> of ampicillin sodium added to the culture medium.

Cultivation time (days)	Bacterial contamination (%)																							
	Visual (%)												Nutrient Agar (%)											
	Number of subcultures																							
	1*		2		3		4		5		6**		1		2		3		4		5		6	
	L***	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
7	9.1	5.9	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.7	1.0	0.1	2.5	9.1	25.0	8.3	6.3	4.2	3.6	1.4	8.1	0.0	6.9	0.0	2.0
15	27.3	5.9	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9	0.7	2.0	0.1	3.0	9.1	25.0	8.3	6.3	4.2	3.6	1.4	8.1	0.0	6.9	0.0	2.0
30	45.5	5.9	8.3	0.0	0.0	8.1	0.0	6.9	0.7	6.9	0.1	3.0	9.1	25.0	8.3	6.3	4.2	3.6	1.4	8.1	0.0	6.9	0.0	2.0

\*\*6: final subculture performed in medium without antibiotic.

\*\*\*L - LBB access; D - DBS64 access

**Table 3.** Data obtained from the sequencing, with the aid of the 16S rRNA primer, of bacterial DNA samples isolated from endophytic bacteria from shoots of *Vanilla phaeantha* Rchb. f., in the in vitro establishment phase.

Isolated	Genus*	Degree of identity (%)	Fragment (pb)
	<i>Agrobacterium</i> sp.	76.9	
B3	<i>Rhizobium</i> sp.	76.9	1811
B4	-	0	927
B5	<i>Herbaspirillum</i> sp.	91.04	1100
B9	<i>Methylobacterium</i> sp.	89.27	1657
B15	-	0	1674
B16	-	0	684

\*Genus proposed by similarity of the isolated sequences with the database.

**Table 4.** Number of shoots per explant of *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews and *Vanilla phaeantha* Rchb. f, cultivated in liquid, double-phase, and semi-solid medium, after 90 days of cultivation

Treatment	N°Shoot / Explant		Average
	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla phaeantha</i>	
Liquid medium	0.1 ± 0.1 cA	0.0 ± 0.0 cA	0.1 c
Double-Phase medium	7.2 ± 0.5 aA	6.8 ± 0.3 aA	7.0 a
Semisolid medium	5.7 ± 0.2 bA	4.8 ± 0.3 bB	5.3 b
Average	4.3 A	3.9 A	

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments, and capital letters between genotypes, by Tukey's test at 5% significance. ± Standard error.

**Table 5.** Number and height of shoots per explant of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. grown in different temporary immersion systems (RITA<sup>®</sup>, RALM<sup>®</sup>, and BIT<sup>®</sup>) and in traditional semisolid medium

Treatment	N° Shoot / Explant	Shoot height (cm)
Semisolid	4.3 ± 0.6 b	0.6 ± 0.1 b
RITA	4.9 ± 0.2 b	0.3 ± 0.1 c
RALM	8.2 ± 0.3 a	1.0 ± 0.0 a
BIT	1.2 ± 0.1 c	0.0 ± 0.0 d

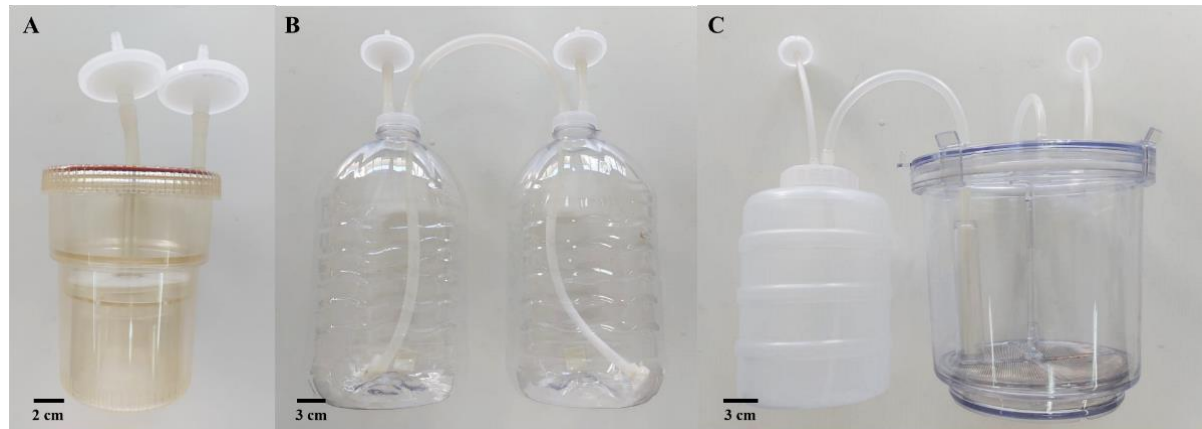
Means±standard error followed by the same lowercase letter in the column do not differ from each other by the Tukey test at 5% significance



**Table 6.** Survival percentage and average height of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. plantlets acclimatized in different substrates (CS – commercial substrate and CF – coconut fiber) combined in various proportions.

Treatment/proportion (v/v)	Survival	Height (cm)
CS	100.0 ± 0.0 a	13.1 ± 0.7 a
CF	50.0 ± 20 b	4.6 ± 1.5 b
CS:CF (1:1)	100.0 ± 0.0 a	12.5 ± 0.6 a
CS:CF (2:1)	100.0 ± 0.0 a	12.6 ± 0.5 a
CS:CF (3:1)	100.0 ± 0.0 a	12.8 ± 0.6 a
CS:CF (1:2)	100.0 ± 0.0 a	10.9 ± 0.5 a
CS:CF (1:3)	100.0 ± 0.0 a	9.7 ± 0.8 a

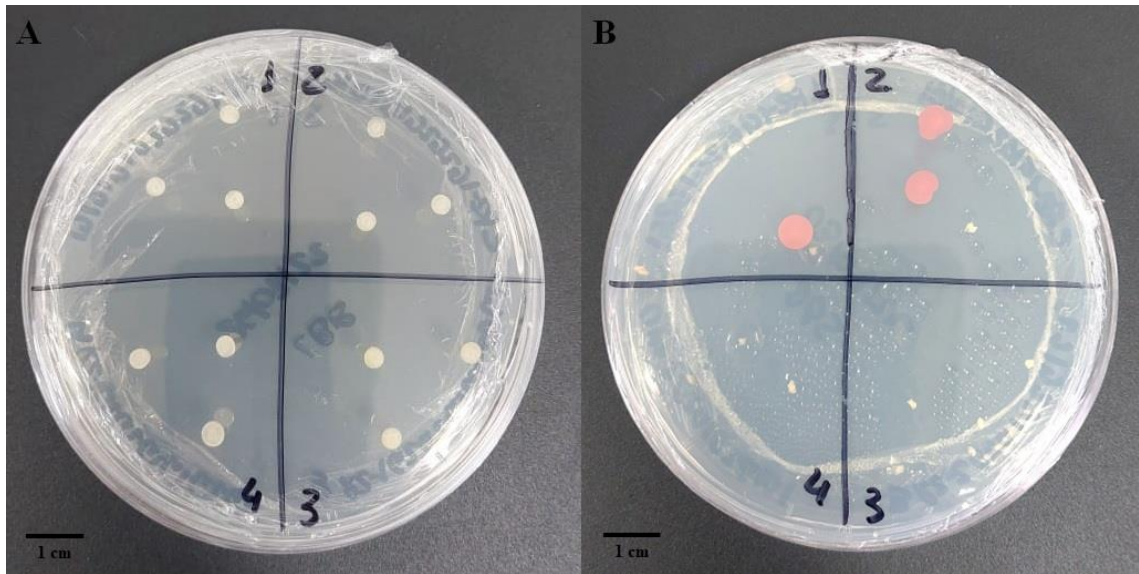
Different lowercase letters indicate a significant difference between treatments by Tukey's test at 5% significance.  
± Standard error.



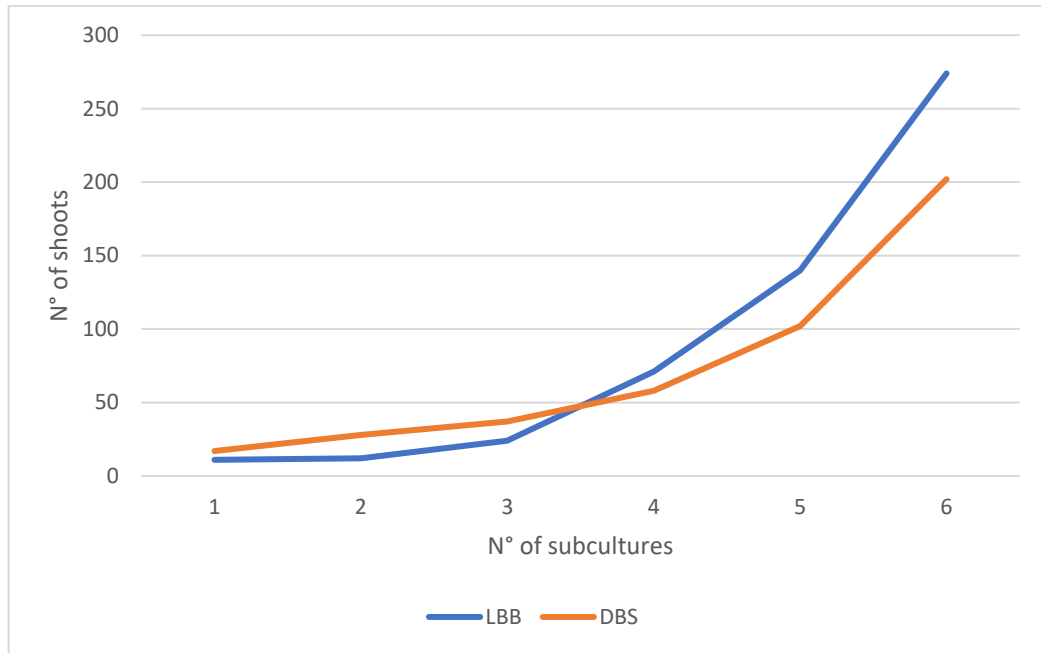
**Fig. 1.** Temporary immersion bioreactors models used for in vitro multiplication of vanilla. A - RITA®. B - BIT®. C - RALM®. Scale: A – 2 cm, B and C – 3 cm.



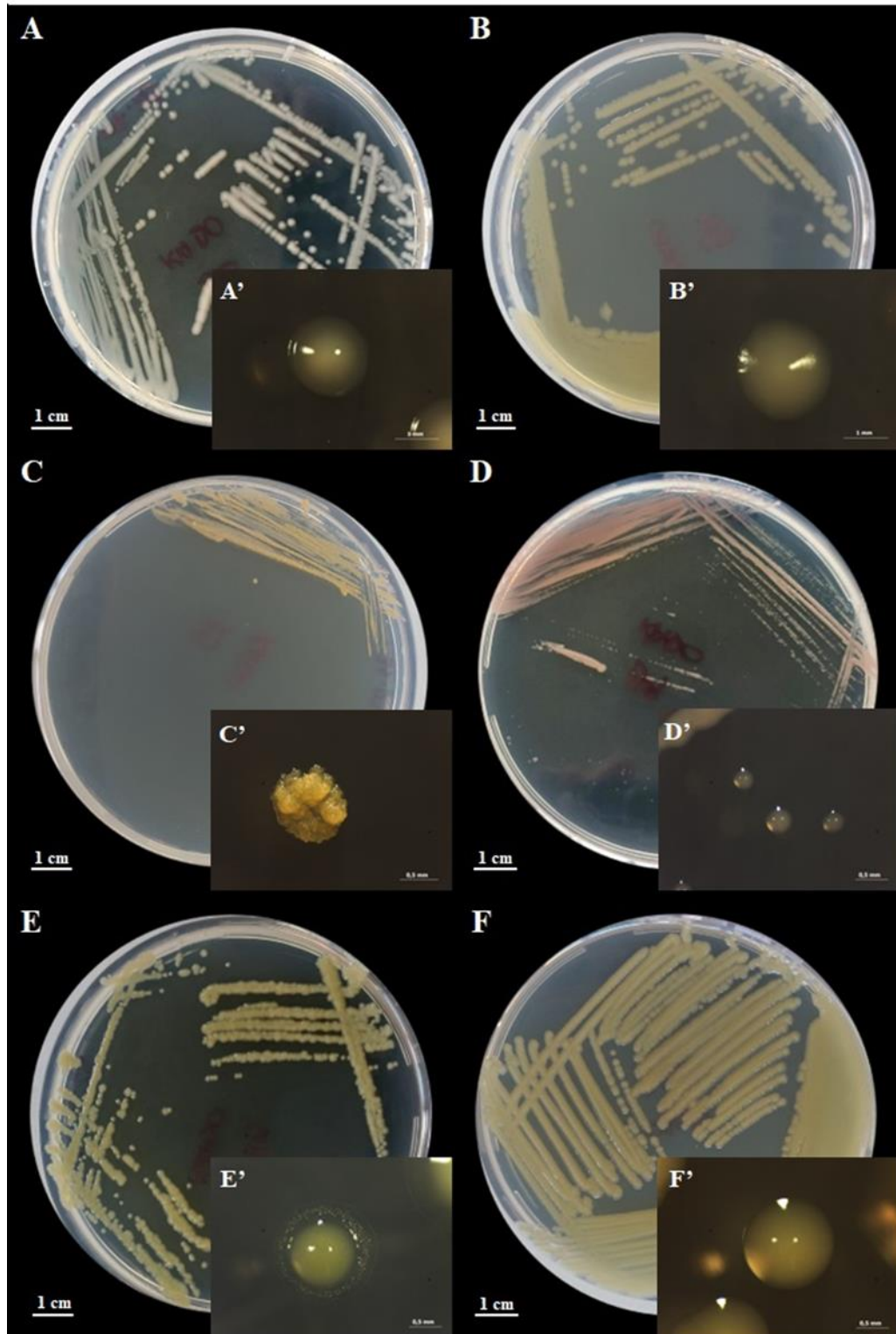
**Fig. 2.** Contamination during in vitro establishment of vanilla (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.). A – Bacterial contamination at different stages. B – Bacterial contamination. C – Bacterial and fungal contamination. Star: fungal contamination. Point: bacterial contamination. Scale: A – 2.5 cm. B and C – 1 cm.



**Fig. 3.** Nutrient agar analysis of endophytic bacterial contamination in *Vanilla phaeantha* Rchb. f., during sixth subcultures in medium with ampicillin sodium. A – LBB accession showing no bacterial contamination. B – Accession DBS647 showing bacterial contamination. Scales: A and B – 1 cm.



**Fig. 4.** Accumulated clonal multiplication rates of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. – LBB e DBS647 accessions, during the bacterial cleaning period. Starting with three microcuttings for LBB accession and four microcuttings for the DBS647 accession.



**Fig. 5.** Isolation and purification of endophytic bacteria in KH medium after 72 hours of growth, from the in vitro cultivation of *Vanilla phaeantha* Rchb. f., during the establishment phase. A e A' – B3. B and B' – B4. C and C' – B5. D and D' – B9. E and E' – B15. F and F' – B16. Escalas: A, B, C, D, E and F – 1 cm. A' and B' – 1 mm. C', D', E' and F' – 0.5 mm.



**Fig. 6.** Effect of different culture medium consistencies (semisolid, double-phase and liquid) on the growth and multiplication of shoots in two vanilla species - *Vanilla phaeantha* Rchb. f. and *Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews. A – Treatments in semisolid, double-phase and liquid media at the beginning of the experiment. B – Treatments after 90 days with *Vanilla planifolia*. C – Treatments after 90 days with *Vanilla phaeantha*. Scale: A, B and C – 1.5 cm.



**Fig. 7.** Evaluation of clonal multiplication of vanilla (*Vanilla phaeantha* Rchb. f.), with the aid of the RALM® model temporary immersion system bioreactor. Scale: 1 cm.





**Fig. 8.** Assessment of root development and acclimatization of *Vanilla phaeantha* Rchb. f., using various substrates combinations. A – Various combinations of commercial substrate and coconut fiber in different combinations. B – Plantlets originating from in vitro culture. C – Plantlets acclimatized within a B.O.D. type growth chamber. D – Plantlets acclimatized after 30-day period. E and F – Plantlets acclimatized after 90-day period within a greenhouse. Scale: B – 2 cm.