Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado[1]

CARLOS DE SOUSA SILVA[2], LEILA GARCÊS DE ARAÚJO[2], KELLEN CRISTHINA INÁCIO SOUSA[2*], DANIELA MOTA SILVA[3], SÉRGIO TADEU SIBOV[3] E PAULO ROBERTO FARIA[3]

RESUMO

Orquídeas são plantas muito procuradas em função da beleza e diversidade, de cores e formatos, de suas flores. Visando obter uniformidade, vigor e sanidade das mudas bem como produzir grandes quantidades para a comercialização usa-se a propagação *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a geminação e o desenvolvimento *in vitro* de *Cyrtopodium saintlegerianum* para aclimatação. Os meios MS, MS½, Knudson C modificado e Simplificado foram testados na germinação das sementes. No desenvolvimento das plântulas foram avaliados os meios Knudson C modificado, MS e MS modificado (adição de auxina e citocinina). Os meios MS, MS½ e Knudson C modificado promoveram germinação acima de 80% após sete dias. Contudo, no meio Simplificado as sementes germinaram após trinta dias. Nas duas avaliações, trinta e sessenta dias após o início do experimento, o meio Knudson C modificado foi eficiente para as variáveis observadas demonstrando seu potencial uso na germinação e desenvolvimento dessa espécie.

Palavras-chave: *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., Orchidaceae, meios de cultivo, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

***In vitro* germination and development of the Cerrado epiphytic orchid**

Orchids are very popular plants due to the beauty and diversity, of colors and shapes, of their flowers. In order to obtain uniformity, vigor and sanity of the seedlings as well as to produce large quantities for the commercialization is used the *in vitro* propagation. The objective of this study was to evaluate the germination and *in vitro* development of *Cyrtopodium saintlegerianum* for acclimatization. The MS, MS½, Knudson C modified and Simplified media were tested on seed germination. In the development of the seedlings were evaluated Knudson C modified, MS and MS modified (addition of auxin and cytokinin). The MS, MS½ and Knudson C modified media promoted germination above 80% after seven days. However, in the Simplified medium the seeds germinate after thirty days. In the two evaluations, thirty and sixty days after the beginning of the experiment, the Knudson C modified medium was efficient for the observed variables demonstrating their potential use in germination and development of this species.

Keywords: *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., Orchidaceae, culture medium, growth regulators.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das mais diversas e representativas do Cerrado (BATISTA et al., 2005). Das cinquenta espécies do gênero *Cyrtopodium* Rchb. que são registradas no Continente Americano cerca de trinta, dentre terrestres e epífitas, ocorrem no Cerrado (BATISTA e BIANCHETTI, 2006; ROMERO-GONZÁLES et al., 2008). *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. é uma orquídea com pseudobulbos alongados e flores amarelas com manchas marrons. Pode ser encontrada como epífita nos estados de Goiás (Figura 1A), Mato Grosso, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo (ROMERO-GONZÁLES et al., 2008; FERREIRA et al., 2010a); ou como terrestre em áreas mistas de mata e savana nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Mato Grosso (BARROS et al., 2011; ZAPPI et al., 2015).

DOI: http://dx.doi.org/10.14295/oh.v23i1.923

[1] Recebido em 02/08/2016 e aceito em 21/02/2017

[2] Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética de Microrganismos, Goiânia-GO, Brasil. *Autor para correspondência: bio.kcisbr@gmail.com

[3] Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Goiânia-GO, Brasil

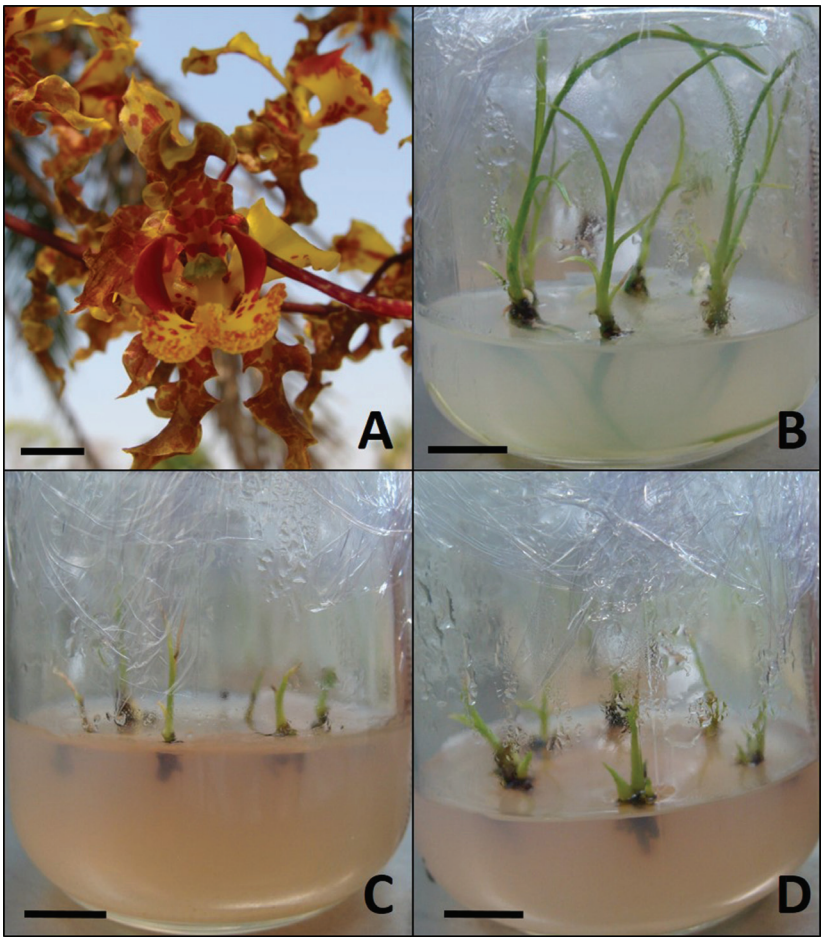

Figura 1. Aspecto geral da flor de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. epífita em área de Cerrado no estado de Goiás (A). Desenvolvimento de plântulas cultivadas em meio Knudson C modificado (B), em meio MS (C) e em meio MS modificado (D). (Barras: 1 cm). (Figuras: Sousa, K. C. I. e Silva, C. S.).

Figure 1. *General aspect of Cyrtopodium saintlegerianum Rchb. f. flower epiphyte in Cerrado area, state of Goiás (A). Development of plantlets in Knudson C modified medium (B), and MS medium (C) and MS modified medium (D). (Bars: 1 cm). (Figures: Sousa, K. C. I. and Silva, C. S.).*

O cultivo *in vitro* de orquídeas em meios nutritivos possibilita rapidez e uniformidade na obtenção de plântulas, enquanto que na natureza a taxa de germinação de sementes é baixa e o desenvolvimento das plântulas é lento (ARDITTI e KRIKORIAN, 1996; STEWART e KANE, 2006). Além disso, em habitat natural as orquídeas necessitam de associações micorrízicas para a obtenção de nutrientes tanto na germinação de sementes bem como na fase adulta (DEARNALEY et al., 2012). No cultivo *in vitro* de orquídeas os meios mais utilizados são o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o Knudson (KNUDSON, 1922). Os constituintes e as quantidades de um meio de cultura são otimizados de acordo com as necessidades nutricionais das plantas. Como exemplo, o meio Knudson C que foi modificado visando o cultivo de orquídeas (ARDITTI, 1977). Em outros estudos também é observada a modificação nos meios ou por adição de hormônios comerciais ou por uso de polpas de frutas (BHADRA e HOSSAIN, 2003; PORNPIENPAKDEE et al., 2010; FAVETTA et al., 2014).

Meio Knudson C suplementado com *6*-benzilaminopurina (BAP), ácido *α*-naftalenoacético (ANA) e ácido giberélico (GA_3) para induzir brotações em protocormos de *C. saintlegerianum* foi testado. Observou-se que relação auxina-citocinina tem influência no aumento do número de brotações, mas que o uso de GA_3 pode interferir negativamente na aclimatação e reintrodução de plântulas (RODRIGUES et al., 2015). Diante o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a germinação de sementes e o rápido desenvolvimento de plântulas de *C. saintlegerianum* em diferentes meios (*in vitro*) visando cultivo sustentável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas sementes de uma cápsula de *Cyrtopodium saintlegerianum* com dez meses de maturação após fecundação cruzada em habitat natural. Na germinação os meios testados foram MS normal, MS com metade de macronutrientes (MS ½); Knudson C modificado por Arditti (1977) e meio Simplificado (Água de coco verde,

Banana nanica e Adubo Foliar – Peter's® NPK 20-20-20). Todos os meios foram acrescidos com 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,7±0,1 antes da adição do ágar. Cada tratamento contendo 20 frascos com 30 mL de meio de cultura e 1 g de sementes. Os frascos foram mantidos sob temperatura de 24±2 °C com 2700 lux de luminosidade e fotoperíodo de 16 h. A cada sete dias foram avaliados os estádios de germinação e o desenvolvimento dos protocormos de acordo com a escala de notas de 0 a 5, a saber: 0 - embrião intacto; 1 - embrião intumescido e presença de rizoides (germinação); 2 - rompimento do tegumento que envolve o embrião; 3 - estabelecimento do protocormo e formação da protuberância foliar; 4 - surgimento da primeira folha; e 5 - alongamento da primeira folha e surgimento da segunda folha (STEWART e KANE, 2006).

Os protocormos (Estádio 5) provenientes da germinação nos meios MS, MS½ e Knudson C modificado foram utilizadas no ensaio de desenvolvimento *in vitro*. Foram testados três meios: Knudson C modificado, MS e MS modificado (com acrécimo de 4 mg L^{-1} de auxina e 1 mg L^{-1} de citocinina). A unidade experimental foi um frasco de vidro de 150 mL, contendo 30 mL de meio e seis plântulas com 0,5 cm de altura. Os frascos foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 24±2 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 1800 lux. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos e trinta repetições. Foram realizadas duas avaliações, após trinta e sessenta dias do início do experimento, das seguintes variáveis: o número de folhas, a altura da parte aérea (cm), o número de brotações e o tamanho da maior raiz (cm). Usou-se paquímetro analógico e as medições foram realizadas externamente, sem a retirada das plantas dos frascos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (5% de probabilidade) utilizando o *Software* R versão 2.11.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sete dias houve germinação de 80% (Estádio 2) nos meios MS, MS ½ e Knudson C modificado. Nesses meios também foi observada a formação de protocormos (Estádio 3) quinze dias após o início do teste. Porém, no meio Simplificado observou-se o Estádio 2 somente trinta dias após a semeadura. Stewart e Kane (2006) testaram a germinação de *Habenaria macroceratitis* em diferentes meios de cultivo e obtiveram formação de protocormos após dezesseis dias nos meios MS normal e Knudson C. Por outro lado, na germinação de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro foram testados os meios MS, MS½ e de Formulação Alternativa (à base de banana) e observou-se que o terceiro promoveu melhores porcentagens de germinação em relação aos demais (FERREIRA et al., 2010b).

Após trinta dias do início do ensaio observou-se o meio Knudson C modificado diferiu estatisticamente dos demais para o número de folhas, altura de plantas e tamanho da maior raiz. Entretanto, não diferiu do meio MS modificado para o número de brotações (Tabela 1). Após dias sessenta de cultivo, mesmo não diferindo estatisticamente do meio MS modificado para duas características avaliadas, observou-se que o meio Knudson C foi o mais eficiente em aumentar o número de folhas e brotações bem como o tamanho da parte aérea (Figura 1B–D, Tabela 1). Após sessenta dias, as raízes cresceram e se entrelaçaram de modo que não foi possível a avaliação do tamanho destas em nenhum dos meios estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Influência dos meios de cultura no número de folhas, na altura da parte aérea, no número de brotações e no tamanho da maior raiz de *Cyrtopodium saintlegerianum*.
Table 1. *Influence of culture media in the number of leaves, the shoot height, number of shoots and the size of the largest root of Cyrtopodium saintlegerianum.*

Meio	Nº de folhas	Altura da parte aérea (cm)	Nº de brotações	Tamanho da maior raiz (cm)
Avaliação após trinta dias				
Knudson C	4,30 a*	3,59 a	2,27 a	4,62 a
MS	2,33 b	1,48 b	0,40 b	0,65 b
MS modificado	2,33 b	1,11 b	2,20 a	0,53 b
Avaliação após sessenta dias				
Knudson C	2,76 a	6,23 a	1,86 a	-
MS	1,91 b	2,08 b	0,41 b	-
MS modificado	2,16 ab	1,13 b	2,24 a	-

*Médias seguidas pela mesma, na vertical, não diferem entre si pelo teste Tukey (nível de significância de 5%).

Em estudos testando o meio Knudson C com 200% de nutrientes com a adição de 2,5 mg L^{-1} de GA_3 observou-se aumento no número de folhas de *Cattleya loggigesii*. Maior número de brotações foi observado quando usada a quantidade normal (100%) dos sais de Knudson C. Para o híbrido *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* verificou-se que o dobro da concentração (200%) aumentou o número de folhas, mas o número de brotações foi maior quando usada a metade da concentração (50%). Notou-se que não houve influência do GA_3 no número de brotos, comprimento da parte aérea e na massa fresca das plântulas do híbrido (SOARES et al., 2009). Testando a influência de fitorreguladores de cultivo em uma espécie nativa (*Laelia crispata* [Thunb.] Garay) e um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant "Tuilerie" *x Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) *x Bassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], notou-se que a primeira apresentou maior número de internós na presença de ANA e na ausência de BAP, e o segundo apresentou maior número de internós quando acrescido de ANA (SOARES et al., 2010). Diferentes concentrações de auxinas no meio MS proporcionaram efeito positivo no crescimento da parte aérea e na formação de brotações de *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. (BHADRA e HOSSAIN, 2003).

O acréscimo de citocinina, em diferentes concentrações, induziu brotações bem como promoveu o desenvolvimento de plântulas de *Dendrobium* sp. híbrido (PORNPIENPAKDEE et al., 2010). Meios suplementados com BAP e ANA influenciaram positivamente no número de brotações de *C. saintlegerianum*, mas a adição de GA_3 não favoreceu na aclimatação destas plantas (RODRIGUES et al., 2015). No presente estudo, o meio MS acrescido de fitorreguladores proporcionou maior número de brotações, mas não diferiu estatisticamente do meio Knudson C. O meio Knudson C é menos dispendioso em sua composição, seu preparo é mais fácil comparando-se aos demais sendo, portanto, eficiente no desenvolvimento de *C. saintlegerianum*. Estudos posteriores poderão avaliar a taxa de sobrevivência destas plântulas quando aclimatadas em estufas ou jardins ou reintroduzidas em troncos de palmeiras em áreas de Cerrado.

4. CONCLUSÃO

O meio Knudson C é recomendado para o desenvolvimento inicial de *Cyrtopodium saintlegerianum* por proporcionar aumento na parte aérea, no número de folhas e no número de brotações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo suporte financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

CSS: realização dos experimentos em laboratório, revisão bibliográfica, análises estatísticas e redação do manuscrito; LGA: orientação nas análises estatísticas e correção do manuscrito; KCIS: revisão bibliográfica, análises estatísticas e redação do manuscrito; STS: supervisão dos experimentos em laboratório bem como a orientação nas análises estatísticas; DMS: suporte técnico/teórico nos experimentos em laboratório, apoio nas análises estatísticas bem como na discussão dos resultados e correção do artigo; PRF: suporte técnico/teórico nos experimentos em laboratório e apoio na discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS

ARDITTI, J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual. *In:* ARDITTI, J. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives.** Ithaca, NY: Cornell University Press., p.203-293, 1977.

ARDITTI, J.; KRIKORIAN, A.D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Botanical Journal of the Linnean Society,** v.122, p.183-241, 1996.

BARROS, F.V.; RODRIGUES, V.T.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M. **Orchidaceae.** *In:* Lista de Espécies da Flora do Brasil (Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB025908>. Acesso em: 20 de agosto de 2011.

BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B. A New Species of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from the Cerrado of Central Brazil. **Novon,** v.16, p.17-22, 2006.

BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B.; PELIZZARO, K.F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** v.19, p.221-232, 2005.

BHADRA, S.K.; HOSSAIN, M.M. *In vitro* Germination and Micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered Orchid Species. **Plant Tissue Culture,** v.13, p.165-171, 2003.

DEARNALEY, J.D.W.; MARTOS, F.; SELOSSE, M.A. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. *In:* HOCK, B. (ed.) **The Mycota IX: fungal associations**, 2 ed., Springer: Berlin, p.207-230, 2012.

FAVETTA, V.; COLOMBO, R.C.; FARIA, R.T. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. **Revista de Ciências Agrárias,** v.57, p.114-117, 2014.

FERREIRA, A.W.C.; LIMA, M.I.S.; PANSARIN, E.R. Orchidaceae na região central de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia,** v.61, p.243-259, 2010a.

FERREIRA, A.W.C.; LIMA, M.I.S.; FARIA, R.T.; RIBEIRO, J.P.N.; CASALI, C.A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica,** v.24, p.636-639, 2010b.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic Germination of Orchids Seeds. **Botanical Gazette,** v.73, p.1-25, 1922.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-497, 1962.

PORNPIENPAKDEE, P.; SINGHASURASAK, R.; CHAIYASAP, P.; PICHYANGKURA, R.; BUNJONGRAT, R.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P.; MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Scientia Horticulturae,** v.124, p. 490-499, 2011.

RODRIGUES, L.A.; PAIVA NETO, V.B.; BOARETTO, A.G.; OLIVEIRA, J.F.; TORREZAN, M.A.; LIMA, S.F.; OTONI, W.C. In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (ORCHIDACEAE), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and Applied Biotechnology, v.**15, p.10-17, 2015.

ROMERO-GONZÁLEZ, G.A.; BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B. A synopsis of the genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: ORCHIDACEAE). **Harvard Papers in Botany,** v.13, p.189-206, 2008.

SOARES, J.D.R.; ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ASSIS, A.A. Concentrações de sais do meio Knudson e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Ciência Rural,** v.39, p. 772-777, 2009.

SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ARAÚJO, A.G. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural,** v.40, p.1941-1947, 2010.

STEWART, S.L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture,** v.86, p.147-158, 2006.

ZAPPI, D.C.; RANZATO FILARDI, F.L.; LEITMAN, P.; SOUZA, V.C.; WALTER, B.M.T.; PIRANI, J.R.; MORIM, M.P.; QUEIROZ, L.P.; CAVALCANTI, T.B.; MANSANO, V.F.; FORZZA, R.C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, p.1085-1113, 2015.