

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE MUDAS DE *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* A PARTIR DE SEMENTES¹

Leila Garcês de Araújo², Iraides Fernandes Carneiro³ e
Anne Sitarama Prabhu⁴

ABSTRACT

IN VITRO PRODUCTION OF SEEDLINGS OF *Cattleya walkeriana* AND *Cyrtopodium palmifrons* FROM SEEDS

Seeds of *Cattleya walkeriana* and *Cyrtopodium palmifrons* (Orchidaceae) were aseptically transferred to culture medium Knudson, MS (Murashige & Skoog) and MS supplemented with IAA (1, 15 and 30 mg L⁻¹) and kinetine (0.25, 5 and 10 mg L⁻¹) for germination. They were kept at room temperature (23±2°C) under fluorescent light for 30 to 45 days. The seedlings were transferred to pots containing culture medium Knudson and incubated for four months at room temperature and transferred to fresh culture medium until the seedlings attained approximately 1.0 to 2.0 cm size for climatization. The *in vitro* cultivation of both plant species was considered viable. However the performance of the two orchids differed in relation to protocorms oxidation levels and *in vitro* growth. The results showed that less concentrated culture medium such as Knudson can be utilized without the addition of growth regulators for the production of *Cattleya walkeriana* as well as *Cyrtopodium palmifrons*.

KEY WORDS: Orchidaceae, tissue culture, orchid.

Sementes de *Cattleya walkeriana* e de *Cyrtopodium palmifrons* (Orchidaceae) foram transferidas assepticamente para meios de cultura Knudson, MS (Murashige & Skoog) e MS suplementado com IAA (1, 15 e 30 mg L⁻¹) e cinetina (0.25, 5 e 10 mg L⁻¹), para germinação. Elas foram incubadas à temperatura de 23±2°C, sob luz fluorescente por um período de 30 a 45 dias. As plântulas obtidas foram repicadas para meio Knudson, permanecendo em incubação por quatro meses e, em seguida, transferidas para meio fresco, até atingirem tamanho para aclimação. O cultivo *in vitro* de ambas as espécies foi considerado viável, havendo comportamento diferente entre as espécies, em relação à produção de protocormóides, níveis de oxidação e crescimento *in vitro*. Os resultados mostraram que um meio menos concentrado como Knudson pode ser utilizado sem adição de reguladores de crescimento para produção de mudas tanto para *Cattleya walkeriana* quanto para *Cyrtopodium palmifrons*.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, cultura de tecidos, orquídea

INTRODUÇÃO

As Orchidaceae constituem uma das maiores famílias de plantas com flores e uma das mais altamente evoluídas (Berg 1998). De acordo com estimativas, existem 700 gêneros e 25.000 espécies, extremamente diversificadas, sendo encontradas em todo o mundo, desde o Ártico até o Antártico

(Kerbaux 1995). Das milhares de espécies existentes, a maioria é originária de regiões tropicais e subtropicais, predominando as formas epifíticas e rupícolas, enquanto, fora dos trópicos, predomina a forma terrestre (Kerbaux 1995).

Cattleya walkeriana e *Cyrtopodium palmifrons* são espécies nativas do Brasil, muito ornamentais e se adaptam bem ao cultivo em vasos (Jim & McQueen

1. Trabalho entregue para publicação em junho de 1999.

2. Bolsista de Doutorado do CNPq do Programa de Pós Graduação da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. C.P. 131 – CEP 74001-970. Goiânia-GO.

3. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. C.P. 131 – CEP 74001-970. Goiânia-GO.

4. Embrapa Arroz e Feijão, C.P. 179 – CEP. 75375-000. Santo Antônio de Goiás-GO.

1993). Como as demais espécies, elas são propagadas naturalmente, através de sementes muito pequenas, sem endosperma, as quais requerem associação com micorrizas para germinação natural. Isto faz com que, apesar das milhares de sementes produzidas por cápsula, apenas algumas cheguem a germinar e que as densidades em populações naturais sejam relativamente baixas (Berg 1998). Contudo, em 1922, o pesquisador Lewis Knudson obteve a germinação assimbiótica das sementes de orquídeas *in vitro* (Faria & Stancato 1998), o que vem possibilitar a expansão da propagação comercial.

A semente de orquídea contém um embrião de, aproximadamente, 0,1 mm, que, durante a germinação, dilata-se para formar uma pequena estrutura denominada protocormo ou protocormóide (Hoffmann et al. 1998). Para a obtenção dos protocormóides *in vitro*, o meio de cultura é dependente da espécie, cultivar ou híbrido, pois, sob a denominação genérica de orquídea, insere-se uma imensa diversidade taxonômica, estrutural, bioquímica, fisiológica e genética (Kerbaui 1995). Os meios de cultura inicialmente empregados foram o de Knudson e de Vacin & Went; atualmente se utiliza também o meio de Murashige & Skoog (1962). Thompson (1977) recomenda a utilização dos meios de Knudson ou o meio MS, ambos suplementados com 1 a 30 mg L⁻¹ de ácido indolacético (IAA) e 0,04 a 10 mg L⁻¹ de cinetina.

As informações quanto ao cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* são escassas, sendo necessário o desenvolvimento de um protocolo apropriado para germinação e crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste trabalho sementes de duas espécies de orquídea, *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons*. As cápsulas contendo as sementes foram coletadas no início da maturação.

Inicialmente, as cápsulas foram lavadas em água corrente e, em seguida, submetidas ao tratamento de descontaminação, em câmara de fluxo laminar, utilizando-se NaOCl 1,5%, durante 30 minutos. Após lavagem em água esterilizada por três vezes, as cápsulas foram cortadas, longitudinalmente, com auxílio de bisturi, para, em seguida, retirar as sementes e colocá-las sobre o meio de cultura.

Foram utilizados dois meios de cultura básicos, ou seja, o Knudson e o MS e nove modificações do meio MS, em que se variaram as concentrações de ácido indolacético - IAA (1, 15 e 30 mg L⁻¹)

e cinetina (0,25; 5 e 10 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. A incubação foi realizada em uma sala de crescimento com temperatura ambiente (23±2°C) sob luz fluorescente por um período de 30 a 45 dias (Tabela 1).

Avaliaram-se tanto a contaminação quanto a oxidação aos 17 dias após a semeadura, sem, no entanto, descartar as placas que se apresentavam parcialmente oxidadas; as contaminadas e totalmente oxidadas foram desprezadas.

A germinação foi avaliada aos 30 dias da semeadura para *C. walkeriana* e aos 45 dias para *C. palmifrons*, época em que ocorreu o início da formação dos protocormóides. Para a germinação, consideraram-se fraca (+) e boa (++), quando menos que 50% e entre 50 a 100% da superfície do meio de cultura estavam cobertas por sementes germinadas, respectivamente.

As plântulas obtidas de *C. walkeriana* foram transferidas para meio Knudson e subcultivadas por duas vezes, permanecendo em incubação por oito meses. O crescimento, após quatro meses de cultivo, foi considerado: a) fraco (+) para uma ocupação menor que 50% da superfície do meio de cultura por protocormóides e plântulas e nos casos em que a maioria das plântulas apresentava altura em torno de 0,3 cm; b) moderado (++) para uma ocupação entre 50 a 80% da superfície do meio de cultura por protocormóides e plântulas, sendo que a maioria destas apresentava altura em torno de 0,5 cm; c) bom (+++) para uma ocupação maior que 80% da superfície do meio de cultura por protocormóides e plântulas, sendo que a maioria das plântulas apresentava altura em torno de 0,8 cm. Aos oito meses de cultivo *in vitro*, as plântulas que apresentavam raízes foram selecionadas e transplantadas para vasos de barro contendo pedaços de telha (terço inferior) e pó de xaxim (dois terços superiores). Em seguida, foram conduzidas e mantidas em casa-de-vegetação com sombreamento de 60% e temperatura ambiente. A umidade relativa do ar foi aumentada através de umidificadores. Os vasos, contendo as plântulas, foram colocados em bandejas de plástico, em cujo interior se mantinha constantemente uma camada de 5 cm de água.

A comparação de germinação e crescimento foi feita apenas entre os tratamentos, ou seja, não foram atribuídas notas comparativas entre as duas espécies trabalhadas.

Tabela 1. Composição dos meios MS e Knudson modificados e utilizados nas fases de germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* (em mg L⁻¹).

Substâncias	Meio MS	Meio Knudson
NH ₄ NO ₃	1650	-
KNO ₃	1900	-
KH ₂ PO ₄	170	250
MgSO ₄ .1H ₂ O	370	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-
(NH ₄) ₂ .H ₂ O	-	500
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	25
Na ₂ -EDTA	37,3	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6	-
H ₃ BO ₃	6,2	-
KI	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
Tiamina	1,0	-
Piridoxina	0,5	-
Ácido nicotínico	0,5	-
Glicina	2,0	-
Sacarose	30000	30000
Ágar	6000	6000
pH	5,8	6,0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à contaminação observou-se um índice de 2,2%, ou seja, apenas uma placa se apresentou contaminada, o que pode ser considerado baixo. Contudo, maiores cuidados com a assepsia na fase de semeadura em câmara de fluxo laminar podem reduzir esse índice para zero, resultado esse obtido em trabalhos anteriores.

As placas semeadas com a espécie *C. palmifrons* apresentaram elevados índices de oxidação quando o meio de cultura continha níveis mais baixos de auxina (1 e 15 mg L⁻¹). Nos meios MS e Knudson e quando a concentração de auxina adicionada ao meio MS foi de 30 mg L⁻¹, não houve oxidação. A germinação ocorreu aos 45 dias após a semeadura, sendo considerada boa nos meios MS e Knudson (Tabela 2).

Placas contendo *C. walkeriana* não apresentaram oxidação e a germinação foi boa em todos os meios de cultura. Após quatro meses de cultivo *in vitro*, as plântulas de *C. palmifrons* apresentaram-se mais desenvolvidas em meio Knudson, enquanto as plântulas de *C. walkeriana*, em meio MS acrescido de 5 mg L⁻¹ de cinetina e 30 mg L⁻¹ de IAA (Figura 1). Plântulas de *C. walkeriana* não se desenvolveram bem em meio MS, sem o acréscimo de fitoreguladores ou em baixos níveis de citocinina (0,25 mg L⁻¹ de cinetina) (Tabela 2).

Tabela 2. Oxidação, germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Cinetina/ IAA (mg l ⁻¹)	Oxidação		Germinação ¹		Crescimento ²	
		<i>C. walke- riana</i>	<i>C. palmi- frons</i>	<i>C. walke- riana</i>	<i>C. palmi- frons</i>	<i>C. walke- riana</i>	<i>C. palmi- frons</i>
MS	0/0	0	0	++	++	+	++
	0,25/1	0	50	++	+	++	++
	0,25/15	0	50	++	+	+	++
	0,25/30	0	0	++	+	+	++
	5/1	0	100	++	+	+	++
	5/15	0	50	++	+	++	++
	5/30	0	0	++	+	+++	++
	10/1	0	0	100	++	+	+ ++
	10/15	0	100	++	+	+	++
	10/30	0	0	++	+	++	++
Knudson	0/0	0	0	++	++	++	+++

1. += Germinação fraca; ++ = Germinação boa.

2. += Crescimento fraco; ++ = Crescimento moderado; +++ = Crescimento bom.

Os meios de cultura sem a adição de fitorreguladores poderiam ser recomendados, na fase inicial, para as duas espécies estudadas, já que a produção de protocormóides é elevada, proporcionando, assim, um bom rendimento na produção de mudas (Figura 1). Além do mais, a não-adição de fitorreguladores ao meio de cultura reduz o custo de produção da muda *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos constatou-se uma diferença de comportamento em relação à oxidação, à formação de protocormóides e ao crescimento *in vitro* das duas espécies estudadas, o que vem de encontro às observações de Kerbauy (1995). A melhor resposta à adição de fitorreguladores ao meio de cultura foi obtida pela espécie *C. walkeriana*, en-

quanto *C. palmifrons* apresentou melhor germinação e crescimento em meios contendo sais minerais e substâncias orgânicas, sem a adição de fitorreguladores.

O tempo de repicagem para meio fresco foi de quatro meses, o que pode ter levado ao menor crescimento das plântulas *in vitro*. Em relação à metodologia utilizada para a aclimatização das mudas, a resposta foi excelente, já que houve 100% de pegamento. Entretanto, observou-se que as mudas apresentam variabilidade em relação ao crescimento.

Sugere-se, para futuros trabalhos, que o período para subcultivo seja de dois ou três meses, o que poderia levar as plântulas a um crescimento mais acelerado.

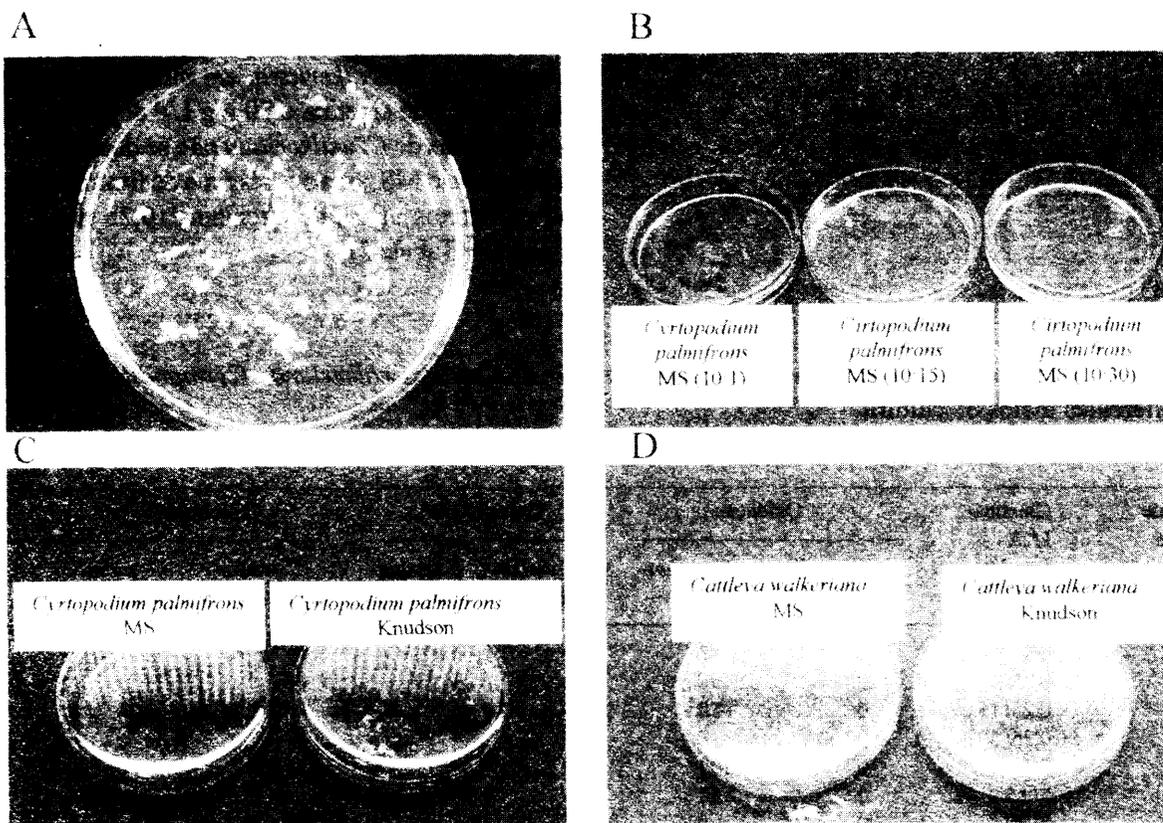


Figura 1. Produção *in vitro* de mudas de orquídeas. a) Semeadura de *Cyrtopodium palmifrons*; b) Produção de protocormóides de *Cyrtopodium palmifrons*, 30 dias após a semeadura; c) Plântulas de *Cyrtopodium palmifrons* obtidas a partir da semeadura em meio Knudson e MS; d) Plântulas de *Cattleya walkeriana* obtidas a partir da semeadura em meio Knudson e MS.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a descontaminação das cápsulas de *Cattleya walkeriana* e de *Cyrtopodium palmifrons* pode ser feita com NaOCl a 1,5 %. A oxidação, a produção de protocormóides e o crescimento *in vitro* variaram com a espécie. A produção de protocormóides de *Cattleya walkeriana* e de *Cyrtopodium palmifrons* se deu em meio MS e Knudson, sem a necessidade da adição de fitorreguladores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berg, C. van den 1998. Banco genético de orquídeas: diversidade e conservação. In Bandel, G. & N. A. Vello. Encontro sobre temas de genética e melhoramento, 15. Piracicaba, SP. Anais.
- Faria, R. T. & G. C. Stancato 1998. Orquídea – semeadura. In Tombolato, A. F. C. & A. M. M. Costa (coord.). p. 37-39. Micropropagação de plantas ornamentais. IAC, Campinas, SP. (Boletim Técnico, 174).
- Hoffmann, A., M. Pasqual, G. R. Carvalho, N. N. J. Chalfun & J. D. Ramos 1998. FAEPE/UFLA, Lavras, MG. 130p.
- Jim, A. & B. McQueen 1993. Orchids of Brazil. The text publishing company Pty Ltd. 200p.
- Kerbaui, G. B. 1995. Biofábrica de orquídeas. In Gerald, L. T. S. (coord.) p. 22-37. Biofábrica: Produção industrial de plantas *in vitro*. Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP.
- Murashige, T. & F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-79.
- Thompson, P. A. 1977. Orchids from seed. London, Mccorquodale Printers. 70p.