

**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (6)

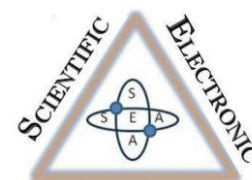
June 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/13620201007>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&op=vi&path%5B%5D=1007&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES, CrossRef



ARCHIVES

ISSN 2316-9281

## Formação e sobrevivência de protocormos *in vitro* de Orquídea do Cerrado de Goiás

### Formation and survival of *in vitro* protocorms of Cerrado Orchid of Goiás

Lemos, D. C. S.<sup>1</sup>, Souza, G. R.<sup>1</sup>, Vaz, A. D.<sup>2</sup>, França, J. B. A.<sup>2</sup>, M. R.<sup>1</sup>, Vieira, M. C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí-GO

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Goiás- Campus Ipameri

<sup>3</sup> Universidade Federal de Goiás

Author for correspondence: [mcvmuza@gmail.com](mailto:mcvmuza@gmail.com)

**Resumo.** O Cerrado possui ampla diversidade vegetal, e entre elas as orquídeas. Essas plantas necessitam de simbiose com fungos para que ocorra sua germinação na natureza. O cultivo *in vitro* ou assimbiótico é uma alternativa para a produção de mudas dessa espécie. Essa diversidade das orquídeas faz com que ela seja muito apreciada como plantas de vaso, paisagismo, com alto valor comercial. Objetivou-se realizar o estudo para o desenvolvimento de um protocolo para a germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia LABIOTEC do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO. As cápsulas de *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás, contendo as sementes maduras foram coletadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 50%, por 30 minutos e em fluxo laminar foram lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, foram semeadas *in vitro* em frascos de vidro de 258 mL, contendo 30 mL do meio MS enriquecido com vitaminas e Tryptona a 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 5,2 ± 0,1. O tempo médio para a germinação e desenvolvimento dos protocormos variou de 3 a 7 dias após a semeadura para a espécie em estudo. A dosagem de 2,0 g L<sup>-1</sup> é eficiente para o desenvolvimento e manutenção de protocormos *in vitro* do gênero *Catasetum* até o período de 333 dias. Não houve desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *Catasetum* em nenhum dos tratamentos avaliados. Observou-se que a dosagem de 3,0 g L<sup>-1</sup> de Tryptona, apresentou maiores índices de contaminação por fungos e bactérias e de oxidação.

**Palavras-chave:** Floricultura, produção de muda, cultura de tecidos.

**Abstract.** The Cerrado has wide plant diversity, including orchids. These plants need symbiosis with fungi for their germination to occur in the wild. *In vitro* or asbiotic cultivation is an alternative for the production of seedlings of this species. This diversity of orchids makes it much appreciated as pot plants, landscaping, with high commercial value. The objective of this work was to carry out the study for the development of a protocol for the germination and *in vitro* development of orchids. The experiment was carried out at the LABIOTEC Biotechnology Laboratory of the Federal Institute Goiano Campus Urutaí-GO. *Catasetum* sp native capsules from Goiás State, containing mature seeds were collected and disinfected in 50% sodium hypochlorite solution for 30 minutes and in laminar flow were washed four times in distilled and autoclaved water. They were then seeded *in vitro* in 258 mL glass vials containing 30 mL of MS medium enriched with vitamins and 0.0 Tryptone; 1.0; 2.0 and 3.0 g L<sup>-1</sup>. The pH of the medium was adjusted to 5.2 ± 0.1. The average time for germination and development of the protocorms varied from 3 to 7 days after sowing for the species under study. The dosage of 2.0 g L<sup>-1</sup> is efficient for the development and maintenance of *in vitro* *Catasetum* protocorms up to 333 days. There was no development of shoot of *Catasetum* seedlings in any of the evaluated treatments. It was observed that the 3.0 g L<sup>-1</sup> Tryptone dosage presented higher rates of fungal and bacterial contamination and oxidation.

**Keywords:** Floriculture, seedling production, fabric culture.

#### Introdução

Estudos sobre a flora do Cerrado apontam riqueza de espécies, sendomuitas delas úteis ao homem, por serem alimentícias, medicinais, ornamentais, forrageiras, apícolas, produtoras de madeira, cortiça, fibras, óleo, tanino, material para artesanato e outros. E, dessa forma,

demonstrando sua importância no desenvolvimento regional (Felfili et al., 2003).

As sementes das orquídeas segundo Moraes, citando Arditti (1992) são muito pequenas. A maioria possui dimensões entre 0,2-0,75 mm de largura por 0,3-5,0 mm de comprimento e são

muitas parecidas entre si quando visualizadas a olho nu, apresentando-se muito variáveis quando observadas com o auxílio de lupa. Os autores ainda salientam que os tegumentos das sementes podem ser duros e coriáceos ou finos.

Por não terem reservas em seu embrião, das 2,5 milhões de sementes produzidas em uma cápsula de orquídea, uma pequena fração germina, cerca 5%, e poucos indivíduos chegarão a fase adulta (Costa et al., 2013 citando Campos, 2004).

O Cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido uma alternativa para a propagação de muitas espécies, entre elas as orquídeas (Costa et al., 2013).

A cultura de tecidos vegetais é um instrumento considerado promissor para a preservação de material vegetal, além da produção em escala comercial; produzindo plantas isentas de patógenos e geneticamente evoluídas (Lopes, 2004).

A micropropagação de plantas pode ser utilizada para produção em larga escala de mudas de orquídeas a partir da germinação e crescimento *in vitro* de plantas, sendo uma técnica amplamente utilizada em plantas de propagação difícil. No entanto, o desenvolvimento de métodos que proporcionem maior crescimento das plantas e redução de distúrbios fisiológicos e anatômicos é necessário para reduzir as perdas na aclimação (Silva, 2014).

Estudos *in vitro* com diversas espécies de orquídeas vêm sendo realizados (Arditti (1992); Saiprasad & Polisetty (2003); Kraus et al. (2006); Dezan et al. (2012); Schneiders et al. (2012); Galdiano et al. (2014); Clavijo et al. (2016); Silva et al. (2016)) no sentido de desenvolver e, ou, otimizar protocolos que sejam efetivos e que estejam disponíveis para o pequeno produtor.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o estudo para o desenvolvimento de um protocolo de cultivo *in vitro* de orquídeas nativas do Cerrado do Estado de Goiás do gênero *Catasetum* sp. bem como, oferecer subsídios de estudos para a

manutenção banco de germoplasma destas espécies nativas.

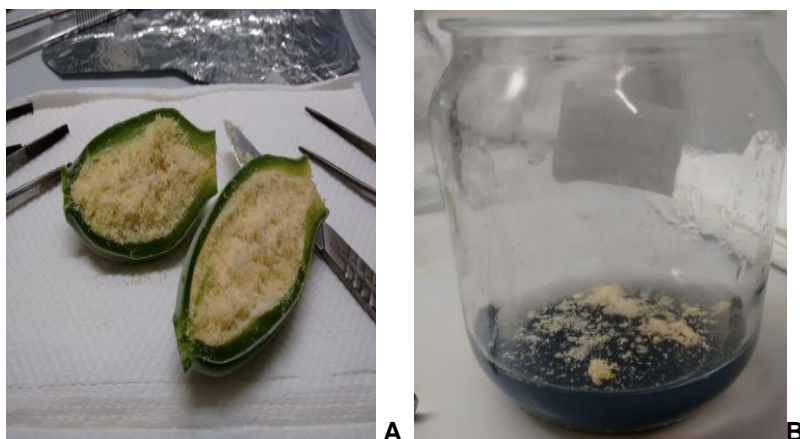
## Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia LABIOTEC do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO. As cápsulas de *Catasetum* sp. nativas do Estado de Goiás (Figura 1-A), contendo as sementes maduras foram coletadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,75%, por 30 minutos. Em câmara de fluxo foram enxaguadas por quatro vezes em água destilada e autoclavada. Logo após foram semeadas *in vitro* em frascos de vidro de 258 mL, com 30 mL do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), modificado com metade dos macronutrientes e acrescido de 1,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 15,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, acrescido de Tryptona a 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio será ajustado para 5,2 ± 0,1 antes da inclusão do ágar.

Os frascos já inoculados (Figura 1-B) foram transferidos para sala de crescimento e mantidos sob ambientes de semi-luz por 7 dias em temperatura de 24 ± 2, °C sendo posteriormente colocados em luz de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luminosidade e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, compondo-se de diferentes dosagens de Tryptona, 5 repetições contendo 5 vidros cada repetição com aproximadamente 0,5 gramas de sementes por frasco.

Foram observados Os índices de esverdecimento; oxidação; contaminação; protocormos; sobrevivência; parte aérea; enraizamento. Foram realizadas avaliações diárias para a observação do tempo de germinação, diagnosticado pela mudança de cor das sementes; a partir do entumescimento da semente, foram realizadas leituras semanais até o aparecimento dos primórdios foliares, e, ou, raízes e uma final aos 333 dias após a semeadura.

Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva, com valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação.



**Figura 1:** A) Cápsula de *Catasetum* sp. nativas do Estado de Goiás. B) Frasco de vidro 258 mL contendo as sementes de *Catasetum* sp. Fotos: Dalilla Cristina Socorro Lemos. Urutaí-GO, 2019.

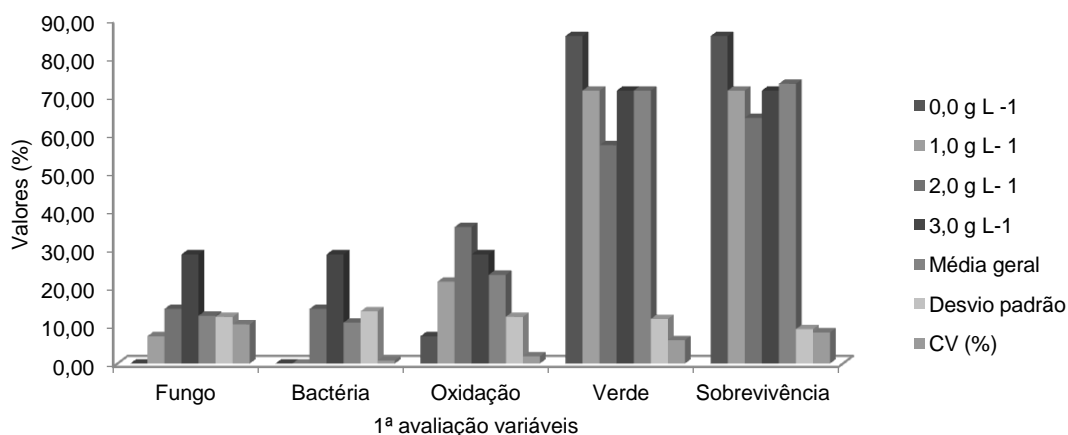
## Resultados e discussão

O esverdecimento dos protocormos (Figura 2) foi verificado em 71,43% dos tratamentos com maior índice no tratamento testemunha, sem adição de Tryptona. Para a sobrevivência dos protocormos, os maiores valores, também foram verificados na testemunha, seguido dos tratamentos com 1,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup>. Constatou-se que as sementes aos 7 dias após a semeadura, já se encontravam em completo processo de esverdecimento. No ensaio de germinação assimbiótica *in vitro* os dados encontrados no presente estudo são superiores aos de Silva et al. (2016) em pesquisa com Cultivo *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) ocorrente no Cerrado da região Centro-Oeste, constataram que foram obtidos protocormos de *E. nocturnum* quinze dias após a semeadura nos meios MS, MS ½ e Knudson C modificado. Os mesmos autores ainda ressaltam que no meio de cultura com Formulação Simplificada observou-se intumescimento dos embriões e formação de rizóides somente trinta dias após a semeadura (dados não publicados).

O maior índice de contaminação foi observado para o tratamento T4 (Figura 2). Também é possível constatar que a média geral de agentes contaminantes foi de 12,50% de fungos e 10,71% de bactérias no referido tratamento.

Percebe-se que o índice de contaminação para o T4 foi alto. Pode-se inferir que as orquídeas por terem relação de simbiose com fungos micorrízicos, talvez possam ter desenvolvido algum mecanismo de resistência ao tratamento asséptico realizado, possibilitando o desenvolvimento desses microorganismos nos frascos. Um dos maiores problemas da produção industrial de mudas é a porcentagem de contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias oportunistas durante as etapas de propagação *in vitro*. Em laboratórios de vários países, do total de contaminação, as perdas causadas por fungos foram de 10,00% a 35,00%. Em biofábricas brasileiras, já foram registradas mais de 30% de contaminação, mesmo com todos os cuidados de assepsia (Klein, 2008).

Quanto ao índice de oxidação esse evento foi registrado em 23,21% dos frascos analisados. Esse processo pode concorrer para a inviabilidade dos protocormos, prejudicando o seu desenvolvimento em plântulas. No presente estudo a oxidação pode ter ocorrido pela exposição à luz. Talvez esta espécie tenha preferência por locais com menores incidências de luz do que o exposto para os tratamentos em questão. O T2,0 g L<sup>-1</sup> apresentou a porcentagem de 40% e a T1, 0 g L<sup>-1</sup> com 20%.



**Figura 2.** Dados de média geral dos índices de protocormos, contaminação, oxidação, protocormos verdes e sobrevivência, após semeadura *in vitro* de orquídeas *Catasetum* sp. nativas do Estado de Goiás em meio de cultura MS 50% enriquecido com diferentes doses de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>). Leitura após 21 dias de cultivo *in vitro*. Urutai-GO, 2019.

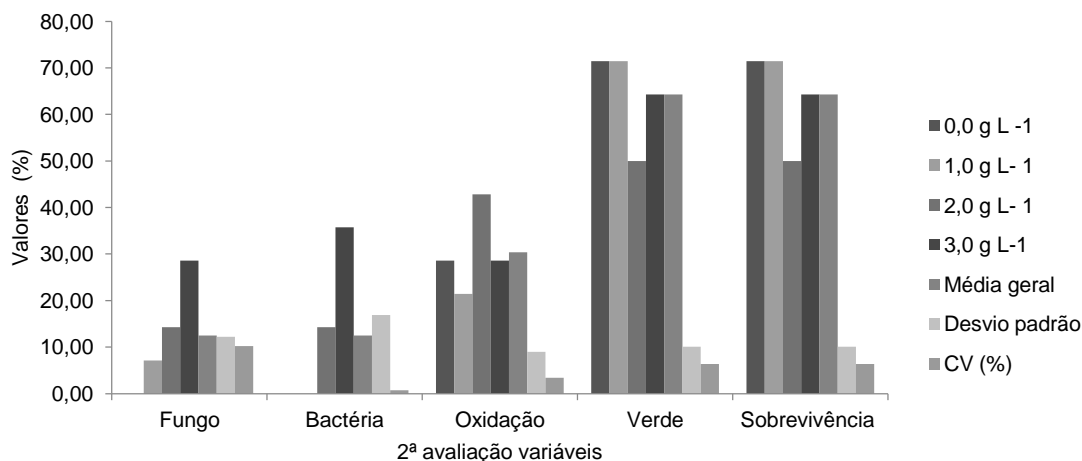
Observa-se (Figura 3) que para o índice de sobrevivência, em 0,0 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup> foi de 70%, fato este observado para o índice de protocormos verdes. A dose de 3,0 g L<sup>-1</sup> apresentou a maior porcentagem com relação a contaminação por fungos e bactérias, sendo 30% e 40% respectivamente. A medida que aumentava a dose de Tryptona nos meios, também houve aumento dos índices de contaminação.

Adotou-se a fase de protocormo como a efetiva germinação de sementes dessa espécie. Dessa forma em avaliação da Germinação,

crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae) Schneiders et al. (2012) verificaram que aos 30 dias em *C. forbesii* uma porcentagem de germinação de 45% em T1 (MS) desprovido de carvão ativado e (T2) com 90% com MS e adicionado 2,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Eles ainda salientam que a adição de carvão ativado ao meio de cultura trouxe aumento na altura de plântulas de *C. forbesii* de acordo com análises realizadas aos 180 dias de cultivo. Em estudo com Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados de

experimento Dezan et al. (2012) verificaram que o meio de cultura que proporcionou maior eficiência no desenvolvimento *in vitro* de sementes foi o MS,

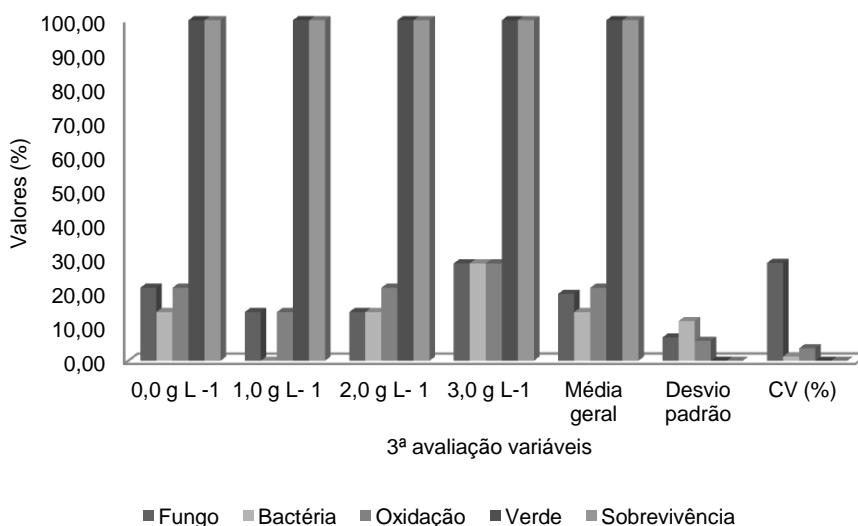
composto por metade da concentração de macronutrientes.



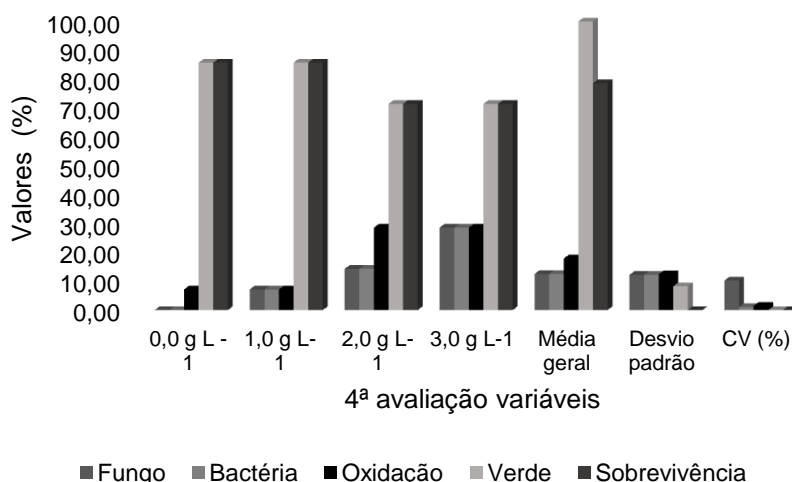
**Figura 3.** Dados de média geral dos índices de protocormos, contaminação, oxidação, protocormos verdes e sobrevivência, após sementeira *in vitro* de orquídeas *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás em meio de cultura MS 50% enriquecido com diferentes doses de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>). Leitura após 26 dias de cultivo *in vitro*. Urutaí-GO, 2019.

Na (Figura 4) constata-se que as médias percentuais obtidas para o índice de sobrevivência e de protocormos verdes comportaram-se de maneira semelhante para as dosagens de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0) g L<sup>-1</sup> em 100%. Na Figura 3, a dosagem de T3 apresentou maior incidência de fungos, bactérias e índice de oxidação. A diversidade existente na natureza para a *Catasetum* sp. permite as manifestações variadas quando submetidas as

diferentes dosagens de Tryptona. Clavijo et al. (2016) em estudos com orquídeas no Município de Fusagasugá (Cundinamarca, Colômbia) sobre o efeito de quatro concentrações (0; 1,5; 3 e 4 mg L<sup>-1</sup>) de ácido naftaleno acético (NAA) foi comprovado ser eficiente no desenvolvimento de *Prosthechea* sp. e protocormo em bioensaio conduzido em condições *in vitro* por 42 semanas.



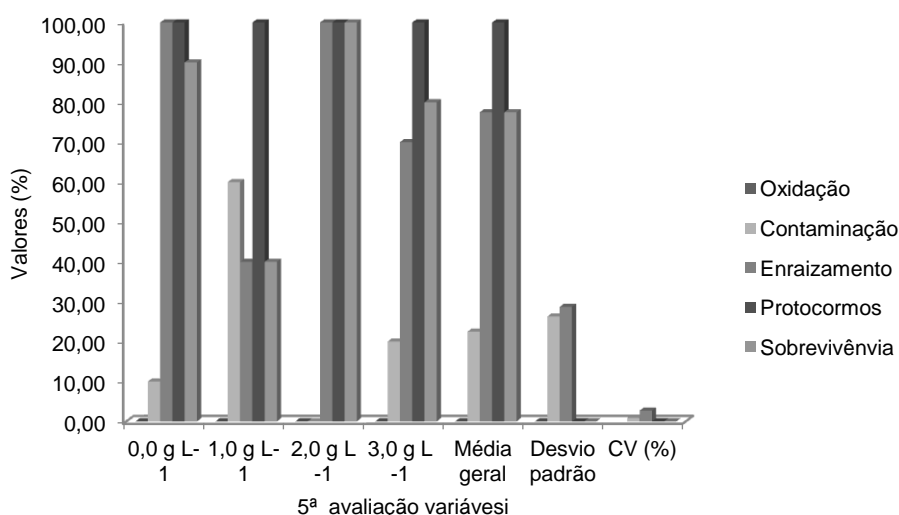
**Figura 4.** Dados de média geral dos índices de protocormos, contaminação, oxidação, protocormos verdes e sobrevivência, após sementeira *in vitro* de orquídeas *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás em meio de cultura MS 50% enriquecido com diferentes doses de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>). Leitura após 49 dias de cultivo *in vitro*. Urutaí-GO, 2019.



**Figura 5.** Dados de média geral dos índices de protocormos, contaminação, oxidação, protocormos verdes e sobrevivência, após sementeira *in vitro* de orquídeas *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás em meio de cultura MS 50% enriquecido com diferentes doses de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>). Leitura após 74 dias de cultivo *in vitro*. Urutai-GO, 2019.

Com os resultados obtidos na (Figura 5) observar – se que para as dosagens de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>) na leitura após 74 DAS de cultivo *in vitro*, as dosagens de 0,0 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup> apresentaram o índice de protocormos verdes e de sobrevivência com percentagens de 90%. Com variação na percentagem para a presença de fungos em que a maior incidência de contaminação e oxidação foi no T3 com a dose de 3,0 g L<sup>-1</sup>. Em contra partida o T3 apresentou o mesmo índice de sobrevivência de protocormos verdes que a dose de 2,0 g L<sup>-1</sup>. Essa variação obtida na dosagem 3,0 g L<sup>-1</sup>

demonstra a sensibilidade do gênero para o desenvolvimento de acordo com as dosagens. Os estudos para averiguação da formação de protocormoides são importantes para definir metodologia de desenvolvimento de orquídeas e sua taxa de manutenção *in vitro*. Nesse sentido é interessante entender que o protocorm é uma estrutura organogênica específica que provém do embrião, geralmente composta por um botão terminal e uma coroa rizóide (Saiprasad & Polisetty, 2003).



**Figura 6.** Dados de média geral dos índices de protocormos, contaminação, oxidação, protocormos verdes e sobrevivência, após sementeira *in vitro* de orquídeas *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás em meio de cultura MS 50% enriquecido com diferentes doses de Tryptona (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 g L<sup>-1</sup>). Leitura após 333 dias de cultivo *in vitro*. Urutai-GO, 2019.

Aos 333 DAS (Figuras 7 e 8) em meio de cultura de MS de 50% constatou-se que as orquídeas do gênero *Catasetum* se adaptaram com

melhor abrangência na dosagem de 2,0 g L<sup>-1</sup> para o fator enraizamento com percentagem de 100%; com índice de protocormos e taxa de sobrevivência com

média de 100%. Assim como esperado, pelo comportamento, ao longo das análises, a dosagem de 3 g L<sup>-1</sup> apresentou o menor índice de enraizamento, fator este atribuído ao comportamento do gênero em alta dosagem de Tryptona. Outras espécies podem apresentar protocormos em diferentes tempos em função dos meios de cultura utilizados e as condições ambientais conforme Galdiano et al. (2014) em

estudo com Morfologia da germinação de sementes e crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner em diferentes meios nutritivos que o embrião de *Cattleya walkeriana* origina, a partir do polo micropilar da semente, uma esférula que gera uma estrutura cônica clorofilada denominada protocormo após 30 dias da semente. Aos 60 dias, o protocormo desenvolve folíolos na parte superior e papilas absortivas na porção inferior

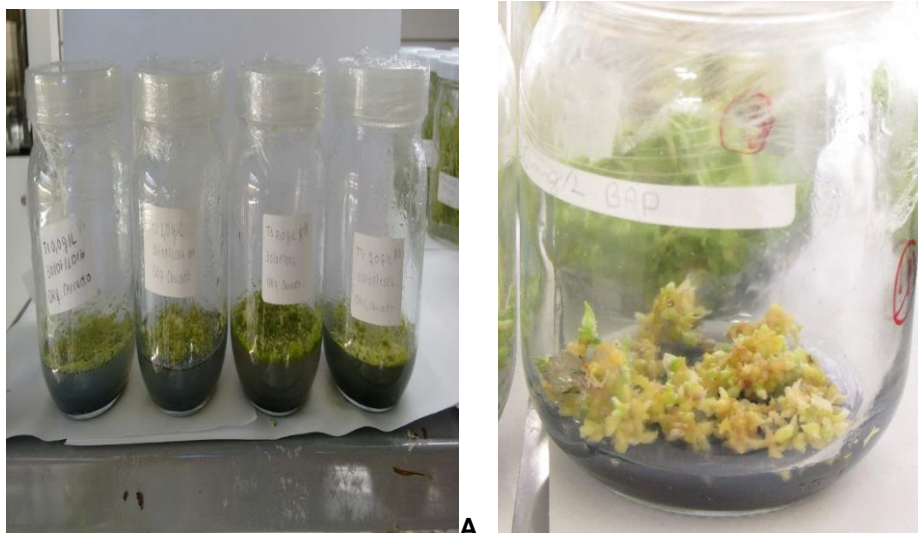


Figura 7: A) cápsula de *Catasetum* sp nativas do Estado de Goiás. B) frasco de vidro 258 mL contendo as sementes de *Catasetum* sp. Fotos: Dalilla Cristina Socorro Lemos. Urutá-GO, 2019.

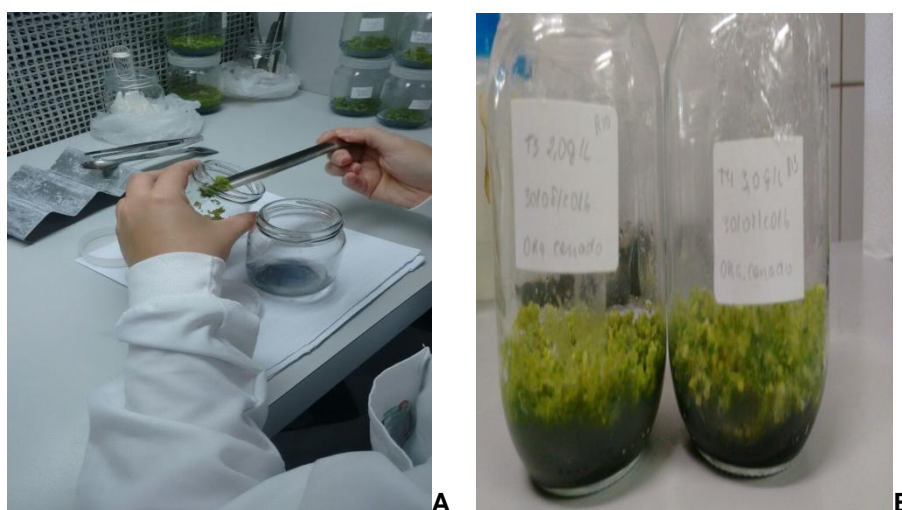


Figura 8: A) Repicagem de protocormos (*Catasetum* sp) orquídeas nativas do Estado de Goiás. B) Frascos com protocormos verdes. Fotos: Dalilla Cristina Socorro Lemos. Urutá-GO, 2019.

### Conclusões

Nas condições em que se realizou o presente estudo, pode-se concluir que:

O tempo médio para a germinação e desenvolvimento dos protocormos variou de 3 a 7 dias após a semente para a espécie em estudo.

A dosagem de 2,0 g L<sup>-1</sup> é eficiente para o desenvolvimento e manutenção de protocormos *in vitro* do gênero *Catasetum* até o período de 333 dias.

A dosagem de 3,0 g L<sup>-1</sup> de Tryptona, apresentou alto índice de contaminação por fungos e bactérias e elevado nível de oxidação.

Torna-se viável a realização de novos estudos para determinar um protocolo de desenvolvimento e clonagem de *Catasetum* sp.

### Referências

ARDITTI, J. Fundamentals of orchid biology. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1992. 691 p.

CLAVIJO, A, I. G., PICO, D. F. C., ROJAS, L. G. Establecimiento *in vitro* de protocormos de Prosthechea sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. MUTIS. 2016; 6(1):6-15.

- COSTA, M. A. P. C.; BASTOS, M. J. S. M. B.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: Aspectos Práticos da Micropropagação. JUNGHANS, T. G.; SOUZA A. S.; Cap.8. p.373 a 392. 2ª Ed. rev. e ampl. Brasília-DF, Embrapa. 2013.
- DEZAN, L. F., CANASSA, F., SOUZA-LEAL, T., DIOGO, J. A., MASSARO, R., CORDEIRO, G. M., MORAES, C. P. G.; Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados *In vitro* growth of *Schomburgkia gloriosa* Lindl. Using simplified culture media. IDESIA (Chile) v. 30, n. 2, Mayo-Agosto, 2012.
- FELFILI, J. M., RIBEIRO, J. F., BORGES FILHO, H. C., VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. Cerrado: ecologia e caracterização. Brasília: Embrapa. 2004. p. 177-220.
- GALDIANO, R. F. J., MANTOVANI, C., GOMES, E. S., GASPARINO, D. C., MORO, F. V. M., LEMOS, E. G. M. Morfologia da germinação de sementes e crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner em diferentes meios nutritivos. *Comunicata Scientiae* 5(4): 456-463, 2014.
- LOPES, K. P., CARVALHO, J. M. F. C., ALMEIDA, F. C. A., ROCHA, M. S. Regeneração de gemas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas., Campina Grande, v.8, n.1, p.771-778, 2004 *hirsutum* L. cv. BRS 201).
- SAIPRASAD, G. V. S., RAGHUVeer, P., KHETARPAL, S., CHANDRA, R. Effect of various growth regulators on production of protocorm like bodies (plb's) in three orchid genera. *Indian J. Plant Physiol.* 7(N.S.):35–39; 2002.
- SILVA, A. B., LIMA, P. P., OLIVEIRA, L. E. S., MOREIRA, A. L. *In vitro* growth handleaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. *PLANT BIOTECHNOLOGY BIOTECNOLOGIA VEGETAL.* Rev. Ceres v.61 no.6 Viçosa Nov./Dec. 2014.
- SILVA, C. S., ARAÚJO, L. G., SOUSA, K. C. I., CARVALHO, J. B. C., GONÇALVES, L. A., CARNEIRO, L. L. Cultivo *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) ocorrente no Cerrado da região Centro-Oeste. *Rodriguésia*, 67(4): 1083-1091. 2016.
- SILVEIRA, D. G.; VIDAL, A. M., LEDO, C. A. S., SANTANA, J. R. F., SOUZA, F. V. D. S. Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroà. *Rev. Ciênc. Agron.* v.44 n.3 Fortaleza July/Sept. 2013.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R., BOOZ, R. M., SUZUKI, M.R. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Rev. Ceres, Viçosa*, v. 59, n.2, p. 185-191, mar/abr, 2012.