

NOTAS CIENTÍFICAS

Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*⁽¹⁾

Priscilla Cavalcante Martini⁽²⁾, Lilia Willadino⁽³⁾, Gilberto Dias Alves⁽³⁾
e Virgínia Maria Tenório Sabino Donato⁽³⁾

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e a organogênese *in vitro* em *Gongora quinquenervis* em dois meios nutritivos, Knudson “C” e Murashige & Skoog, com três concentrações de BAP (0,0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Os protocormos cultivados no meio Knudson “C” necrosaram. A maioria dos embriões cultivados em meio Murashige & Skoog tendeu a diferenciar-se em calos. Estes calos apresentaram alto potencial morfogênético, regenerando grande número de plantas via organogênese indireta, sobretudo no material proveniente do tratamento desprovido de BAP. Foram formadas 41 plantas pela rota normal de germinação, contrastando com 715 plantas regeneradas via organogênese indireta.

Termos para indexação: calos, protocormos, germinação, organogênese.

Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* by *in vitro* germination

Abstract – The aim of this experiment was to study *in vitro* germination and organogenesis of *Gongora quinquenervis* in two culture media (Knudson “C” and Murashige & Skoog) on three concentrations of BAP (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹). The protocorms cultured on Knudson “C” medium died. The majority of the embryos cultured on the Murashige & Skoog medium formed calli. The calli presented a high morfogenic potential, regenerating great number of plant through indirect organogenesis, and the treatment without BAP presented the highest regeneration frequency. Few plants were germinated through the normal route, performing a total of 41 plants, which contrasts with the 715 plants regenerated through indirect organogenesis.

Index terms: calli, protocorms, germination, organogenesis.

A espécie de orquídea *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón é uma das 25 espécies pertencentes a este gênero amplamente cultivado. A espécie é epifítica e apresenta inflorescência racemosa, multiflora e muito perfumada.

A cultura de tecidos é freqüentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993).

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 13 de novembro de 2000.

⁽²⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, CEP 52171-900 Recife, PE. Bolsista do Pibic/CNPq. E-mail: pcmartini@hotmail.com

⁽³⁾ UFRPE, Dep. de Biologia. E-mail: lilia@truenet.com.br, gilbertoda@ipa.br, virginia@ipa.br

A cultura assimiótica ou sementeira *in vitro*, de orquídeas, constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbioses muitas vezes espécie-específicas.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos visando otimizar a sementeira *in vitro* de orquídeas. A adição de BAP (6-benzilaminopurina) no meio de cultura para germinação de sementes de orquídeas tem apresentado resultados contrastantes. Efeitos positivos, como a redução do tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*, foram observados por Pauw et al. (1995), em razão da adição de BAP ao meio de Murashige & Skoog (1962). Por outro lado, a adição de BAP a diversos meios nutritivos resultou em efeitos deletérios para a germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium eugenii* e *C. cristatum* (Caramaschi & Caldas, 1999). Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciado que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (Arditti & Ernst, 1993).

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um meio de cultura adequado à germinação de sementes da espécie *Gongora quinquenervis*, visando a produção de plantas de qualidade no menor tempo possível de cultivo.

Cápsulas maduras de *Gongora quinquenervis* foram abertas no sentido de sua deiscência, de modo a dividir os três carpelos, utilizando-se pinça e bisturi. Após desinfestação com água sanitária comercial à concentração de 0,5% (v/v), as sementes foram submetidas a inoculação em tubos de ensaio de 25 x 125 mm contendo 10 mL de meio nutritivo; cada tubo recebeu aproximadamente 100 sementes.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura foram o de Knudson "C" modificado por Arditti & Ernst (1993), com pH ajustado em 5,2 e o meio Murashige & Skoog (1962), com pH ajustado para 5,8; ambos os meios continham três níveis de BAP: 0,0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, constituindo um experimento fatorial (2x3), com dez repetições por tratamento, em um delineamento inteiramente casualizado. Após a inoculação, os explantes foram mantidos a uma temperatura de 25±1 °C, e fotoperíodo de 16 horas luz, com luminosidade de aproximadamente 100 μmols m⁻² s⁻¹.

Foram observadas as seguintes variáveis: fases de desenvolvimento dos embriões, número de plântulas formadas a partir da germinação das sementes, e número de plantas formadas a partir da diferenciação dos calos. Calos com 90 dias de cultivo foram utilizados para a caracterização histológica. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 15 dias de cultivo, os embriões apresentavam-se alargados na direção transversal, com forma de pequena esférula. A partir de 15 dias de cultivo no meio Knudson "C" modificado, observou-se um rápido declínio da cultura, caracterizado pela total necrose dos embriões aos 22 dias de cultivo. O meio

Knudson "C" modificado caracteriza-se pela ausência de N orgânico, bem como por baixas concentrações de amônia e nitrato, quando comparado ao meio MS. Ainda na década de 40, Spoerl (1948) e Spoerl & Curtis (1948) demonstraram que a utilização de NH_4NO_3 , como fonte de N, favoreceu a germinação de embriões de *Epidendrum cochleatum*, *Cattleya amethystoglossa*, *C. trianaei* e *C. mollie*, especialmente nos tratamentos expostos à luz. Raghavan & Torrey (1964) e Mercier & Kerbauy (1991) constataram que distintas fontes de N provocam diferenças nas taxas de síntese de certas substâncias, como 2iP, zeatina e clorofila, assim como na atividade metabólica e no desenvolvimento de protocormos de orquídeas. O meio nutritivo Knudson "C" é considerado, até os dias atuais, como um dos mais adequados à germinação de orquídeas epifíticas tropicais. Entretanto, os resultados obtidos no presente experimento sugerem que embriões da espécie *Gongora quinquenervis* requerem, para sua germinação e desenvolvimento, um meio nutritivo mais complexo e/ou mais concentrado.

Os embriões cultivados em meio MS aos 20 dias após a inoculação já haviam, em sua grande maioria, rompido a testa, caracterizando o processo de germinação (Miyoshi & Mii, 1998).

Aos 30 dias, os protocormos oriundos dos tratamentos com BAP, 0,5 e 1,0 mg L^{-1} apresentavam região apical de coloração verde mais escura do que os protocormos do tratamento controle. Resultado similar foi obtido por Kerbauy & Handro (1981), cultivando embriões de *Cattleya intermedia*, *C. guttata* e *Epidendrum mosenii* em meio Knudson "C" acrescidos de BAP. Gailhofer & Thaler (1975) observaram que a presença de BAP no meio nutritivo induz aumento no número de cloroplastos jovens e o retardo de sua degeneração. Os rizóides, ou, segundo Arditti (1992) e Knudson (1922), pêlos epidérmicos, eram visíveis ao estereomicroscópio, assim como o desenvolvimento dos primórdios foliares, os quais se apresentavam mais desenvolvidos na concentração mais baixa de BAP e menos abundante, à medida que aumentavam as concentrações de BAP.

Aos 60 dias de cultivo, no tratamento com 1,0 mg L^{-1} de BAP, observavam-se protocormos em estádios de desenvolvimento variado. Alguns dos protocormos, pouco diferenciados, necrosaram. Poucos protocormos apresentavam rizóides, e esses tinham comprimento inferior ao dos observados nos demais tratamentos. Poucos seguiram a rota de diferenciação e desenvolvimento, peculiar aos embriões zigóticos. No tratamento com 0,5 mg L^{-1} de BAP, os protocormos encontravam-se em estádios de desenvolvimento variados. O tratamento sem BAP apresentou protocormos em estádios de desenvolvimento mais uniformes; não houve necrose, e a diferenciação da parte aérea, bem como as primeiras raízes definitivas, eram facilmente visualizadas. A abundância de rizóides nos protocormos cultivados em ausência de BAP foi alta, superior aos do tratamento com 0,5 mg L^{-1} de BAP. Gailhofer & Thaler (1975) também observaram o retardo da diferenciação e desenvolvimento de células e tecidos em protocormos de *Cymbidium* sp., em consequência da adição BAP ao meio nutritivo.

Aos 90 dias de cultivo, o material vegetal de todos os tratamentos foi transferido para tubos de ensaio contendo meio MS sem reguladores de cres-

cimento, com a finalidade de favorecer a rizogênese nas plântulas provenientes dos embriões, e a diferenciação dos calos em plantas. Observaram-se protocormos de coloração verde brilhante no tratamento inicialmente sem BAP, muitos destes com raízes definitivas, além de muitos rizóides. O nível de desenvolvimento observado nos protocormos em tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP era marcadamente inferior. Os protocormos encontravam-se pouco diferenciados, e primórdios foliares não eram visualizados; apenas a pequena protuberância verde mais escura da região proximal que indica a localização do meristema era visualizada. Poucos rizóides foram visualizados, e raízes eram ausentes. Em contraste com estes resultados, Pauw et al. (1995) observaram que a adição de $0,08$ e $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP ou 2iP, respectivamente, promoveu diminuição no tempo de germinação e o incremento da porcentagem de embriões germinados em *Cypripedium candidum*. Waes & Deberg (1986) também verificaram que embriões de *Cypripedium calceolus* tiveram o tempo de germinação diminuído e a porcentagem de germinação incrementada pelo BAP.

Ao término do experimento, 180 dias de cultura, o número de plântulas de origem zigótica não enraizadas, em média 13,7, foi similar no material procedente de todos os três tratamentos (Figura 1). Por outro lado, o maior número de plântulas enraizadas, 17, foi observado nas plântulas provenientes do tratamento sem BAP. Tal resultado reforça a tendência a uma inibição da rizogênese em *Gongora quinquenervis* cultivada *in vitro* na presença de BAP, a qual foi reportada por diversos autores em outras espécies de orquídeas (Pauw et al., 1995). Os calos, entretanto, apresentaram grande potencial morfogênético sobretudo no material inicialmente cultivado sem BAP. Nos demais tratamentos, foi observada uma diminuição da proliferação dos calos, bem como do seu potencial morfogênético, o que sugere que o BAP possua ação inibitória na proliferação e morfogênese da espécie aqui estudada. Ao final dos 180 dias de cultivo, o total de plantas regeneradas via organogênese indireta, 715, foi superior ao total de plântulas obtidas mediante germinação. O maior número de plantas enraizadas, via calo, foi obtido no material proveniente do tratamento sem BAP (86 plantas). Observou-se a formação de brotações múltiplas sobretudo nos calos cultivados sem BAP durante todo o período experimental. Barabé et al. (1993) também reportaram brotações múltiplas em embriões maduros de *Cypripedium acaule* cultivados em meio nutritivo sem reguladores de crescimento. Estes autores propuseram um modelo no qual um único protocormo possuía muitos epiblastos ou centros generativos, cada um capaz de produzir uma planta.

As características organogênicas dos calos foram confirmadas pela análise histológica dos calos fixados aos 90 dias de cultivo. Esse estudo evidenciou a presença abundante de pontos de diferenciação nos calos inicialmente cultivados com $0,0$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP; tais estruturas foram pouco visualizadas nos calos procedentes do tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Os pontos de diferenciação observados nos cortes histológicos caracterizaram-se pela visualização do meristema apical e primórdios foliares.

Aos 180 dias de cultivo, a maioria das plantas desenvolvidas o suficiente para serem aclimatadas (aproximadamente 50 mm de altura) foram as oriundas

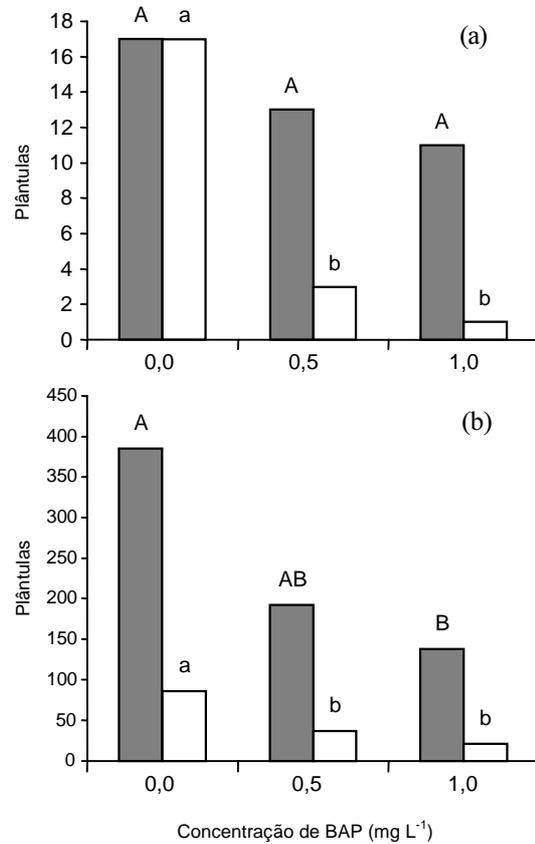


Figura 1. Número de plântulas de origem zigótica (a) e formadas a partir de calos (b) com raízes (■) e sem raízes (□) aos 180 dias de cultivo em meio MS. Médias com letras distintas, maiúsculas (■) e minúsculas (□), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

do tratamento sem adição de BAP. O substrato empregado foi fibra de xaxim e esfagno (*Sphagnum* sp.) desidratado, na proporção de 2:1. Aos 60 dias de cultivo em casa de vegetação, as plantas apresentavam sistema radicular muito bem desenvolvido.

Referências

- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: J. Wiley, 1992. 691 p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682 p.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D. Sur la nature des protocormes d' Orchidées (Orchidaceae). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 316, p. 139-144, 1993.

- CARAMASCHI, G. M. C. L.; CALDAS, L. S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, p. 175, 1999. Suplemento.
- GAILHOFER, M.; THALER, I. Einfluss von 6-Benzylaminopurin auf die Feinstruktur von Mitochondrien und Plastiden *in vitro* kultivierten Protokorme von *Cymbidium*. **Phyton**, Vicente Lopez, v. 17, p. 159-165, 1975.
- KERBAUY, G. B.; HANDRO, W. Culture of orchid embryos in liquid medium. **Orchid Review**, London, v. 36, n. 89, p. 316-318, 1981.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 138, p. 195-199, 1991.
- MIYOSHI, K.; MII, M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokines on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 102, p. 481-486, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAUW, M. A. de; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London, v. 75, p. 267-275, 1995.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid *Cattleya*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 51, p. 264-274, 1964.
- SPOERL, E. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, p. 88-95, 1948.
- SPOERL, E.; CURTIS, J. T. Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos: III. Aminoacid nitrogen. **American Orchid Society Bulletin**, Palm Beach, v. 17, p. 307-312, 1948.
- WAES, J. M. van; DEBERG, P. C. *In vitro* germination of some western European orchids. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, p. 253-261, 1986.