



GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Epidendrum carpophorum* BARB. RODR EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

SARA CRISTINE FARIAS DE OLIVEIRA; JÉSSICA BIANCA REIS DE BRITO; HÉRICA SANTOS DE OLIVEIRA; ANA MARIA MOREIRA FERNANDES; JOANNE MORAES DE MELO SOUZA

RESUMO

Epidendrum carpophorum Barb. Rodr., pertencente à família Orchidaceae, é uma espécie epífita que possui características ornamentais de elevada importância econômica, o que acarreta a retirada predatória do seu habitat natural. As técnicas de cultivo *in vitro* podem ser uma alternativa para o cultivo de orquídeas, aumentando a germinação e obtendo maior número de plantas saudáveis e com qualidade. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do meio de cultura na germinação e desenvolvimento *in vitro* de sementes de *Epidendrum carpophorum* Barb. Rodr. que facilitará o desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropropagação dessa orquídea. A coleta das cápsulas foi no orquidário do Bosque Rodrigues Alves, e levadas ao Laboratório de Biotecnologia da UFRA em Belém, Pará. As cápsulas, fechadas e imaturas de *E. carpophorum* foram inicialmente desinfestadas e inoculadas em 5 tratamentos e 10 repetições para a germinação *in vitro*: MS (T1); MS + 2,5g L⁻¹ de carvão ativado (CA) (T2); meio ½ MS (T3); meio ½ MS + 2,5g L⁻¹ de CA (T4) + meio comercial B&G® (T5). Aos 60 dias, foi avaliado os parâmetros de porcentagem de contaminação e germinação das sementes. Para o estudo do desenvolvimento *in vitro* dos protocormos e formação das plântulas foram testados 5 tratamentos com 5 repetições, sendo: MS (T1); MS + 2,5g L⁻¹ de carvão ativado (CA) (T2); meio ½ MS (T3); meio ½ MS + 2,5g L⁻¹ de CA (T4) + meio comercial B&G® (T5). Após 180 dias, foram avaliados os parâmetros de: peso fresco (g), altura média das plântulas (cm), nº médio de folhas, comprimento de folha (cm) e comprimento de raiz (cm). Os dados obtidos foram tabulados e calculado a média dos parâmetros analisados. Aos 60 dias, foi observado que a espécie apresentou resultados satisfatórios quando cultivados no meio T3. Para o desenvolvimento *in vitro* de protocormos e formação de plântulas, os meios que obtiveram melhores resultados foram o T1, T2 e T4, respectivamente. No geral, pôde-se observar que o uso de carvão ativado promoveu bom desenvolvimento de plântulas.

Palavras-chave: Micropropagação; Orquídeas; Cultura de tecidos; Orchidaceae; Meio nutritivo.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Flora e Funga do Brasil (2020) *Epidendrum carpophorum* Barb. Rodr., espécie objeto do presente estudo, é uma orquídea altamente representativa na região neotropical de distribuição nos estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Pará e Rio de Janeiro (BARROS *et al.*, 2015). *E. carpophorum* apresenta sépalas e pétalas de cor marrom-amarelada e labelo de menor tamanho (KOCH; SANTOS; ILKIU-BORGES, 2014). Esta espécie epífita cresce em locais próximos a cursos d'água, em florestas de várzea e igapó, principalmente em

florestas ribeirinhas (SILVA; SILVA, 2010). Devido às suas características ornamentais, medicinais e alimentícias, apresentam elevada importância econômica e, por isto, em muitos casos, são alvos de extrativismo predatório (SCHNEIDERS *et al.*, 2012; HINSLEY *et al.*, 2017).

As técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (SUZUKI *et al.*, 2009). A micropropagação, como uma técnica da cultura de tecidos, é utilizada como alternativa viável para obtenção de mudas com alta qualidade genética, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano. Do ponto de vista conservacionista, o uso dessa ferramenta é importante, pois ajuda a reduzir o risco de extinção ao obter grandes quantidades de plantas de alta qualidade fitossanitária em um período de tempo relativamente curto (SUZUKI *et al.*, 2009). Dessa forma, torna-se necessário o emprego dessas técnicas, como a micropropagação, com objetivo de preservação e produção de plantas com alta qualidade fitossanitária para evitar a sua retirada predatória do habitat.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes meios de cultura na germinação e desenvolvimento *in vitro* de sementes de *Epidendrum carpophorum* Barb. Rodr. que facilitará o desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropropagação dessa orquídea.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, campus de Belém, Pará no período de janeiro/2022 a abril/2022. Inicialmente, foram coletadas cápsulas imaturas fechadas de *E. carpophorum* no orquidário do Bosque Rodrigues Alves – Jardim Zoobotânico da Amazônia. Para a assepsia do material, as cápsulas foram lavadas com água corrente com detergente neutro. Após isto, em Câmara de Fluxo Laminar, foram imersas em solução de álcool etílico 70% (v/v) por 2 min. Posteriormente, as cápsulas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) por 30 min, seguido de três lavagens em água destilada estéril.

Para a germinação *in vitro*, as cápsulas de *E. carpophorum* foram abertas com auxílio de um bisturi e as sementes foram inoculadas em frascos contendo 30ml de meio de cultura. Foram avaliados para a germinação 5 tratamentos e 10 repetições cada, sendo: meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); meio MS + 2,5g L⁻¹ Carvão Ativado (CA); meio MS com metade das concentrações de sais (½ MS); meio ½ MS + 2,5g L⁻¹ de CA, todos estes acrescidos de 20g L⁻¹ de sacarose; meio B&G® comercial para orquídeas. Todos os meios foram solidificados com 2,5g L⁻¹ de Phytigel® e o pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem por 20 min a 121°C e 1 Kgf.cm². Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentarem protocormos de coloração verde, sendo as avaliações realizadas semanalmente. Com 60 dias, foram avaliados porcentagem de contaminação e de germinação *in vitro*. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentarem protocormos de coloração verde.

Para o desenvolvimento *in vitro*, protocormos de *E. carpophorum* em estágios iniciais globulares sem evidência de primórdios foliares foram inoculados em frascos com 30 mL de meio de cultura. Foram utilizados 5 tratamentos contendo 5 repetições, sendo: meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); meio MS + 2,5g L⁻¹ Carvão Ativado (CA); meio MS com metade das concentrações de sais (½ MS); meio ½ MS + 2,5g L⁻¹ de CA, todos estes acrescidos de 20g L⁻¹ de sacarose; meio B&G® comercial para orquídeas. Todos os tratamentos foram solidificados com 2,5g L⁻¹ de Phytigel® e o pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem por 20 min a 121°C e 1 Kgf cm². Cada tratamento foi composto por 5 repetições contendo 5 protocormos cada frasco. Após 180 dias, foram avaliados o desenvolvimento caracterizado pelo

peso fresco (g), altura média das plântulas (cm), nº médio de folhas, comprimento de folha (cm) e comprimento de raiz (cm). Os dados obtidos foram tabulados e calculado a média dos parâmetros analisados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Germinação *in vitro*

Com 30 dias todos os tratamentos apresentaram 100% de germinação caracterizado por início do desenvolvimento de protocormos, após o rompimento da testa da semente. Os protocormos se apresentaram globulares e verdes e seu desenvolvimento ocorreu através de um processo morfogênico gradual.

Como mostrado na Tabela 1, aos 60 dias após a inoculação, 100% das sementes germinaram, com o destaque para o T3 (meio $\frac{1}{2}$ MS) que obteve melhor qualidade na germinação, indicando que a menor concentração de sais favorece a germinação. Segundo Silva *et al.* (2016) após sete dias houve germinação de 80% nos meios MS, $\frac{1}{2}$ MS e Knudson C modificado em *Epidendrum nocturnum*. No tratamento T1 (MS) os protocormos se apresentaram globulares, desenvolvidos, verdes, porém, sem a presença de primórdios foliares aparentes (Tabela 1). Já nos tratamentos T4 ($\frac{1}{2}$ MS +CA), T2 (MS+ CA) ambos com carvão e T5 com meio comercial B&G®, apresentaram protocormos menores e poucos apresentaram primórdios foliares.

Tabela 1. Avaliação da germinação *in vitro* de *Epidendrum carphophorum* em diferentes meios de cultura aos 60 dias.

Tratamentos	Porcentagem de Germinação (%)	Aspecto dos protocormos	Coloração
T1 (MS)	100	Desenvolvido	verde
T2 (MS+ CA)	100	Pouco desenvolvido	verde
T3 ($\frac{1}{2}$ MS)	100	Bastante desenvolvido	verde
T4 ($\frac{1}{2}$ MS +CA)	100	Pouco desenvolvido	verde
T5 (B&G®)	100	Pouco desenvolvido	verde

A contaminação na germinação *in vitro* foi baixa, sendo a maior porcentagem no tratamento T2 (20%) com fungos, seguido do T3 com 10% de contaminação fúngica e T4 com 10% de contaminação bacteriana. Não houve contaminação nos tratamentos T1 e T5. Esses resultados mostram-se próximo da média, quando comparado com laboratórios de vários países, do total de contaminação, as perdas causadas por fungos foram de 10,0% 35,0%. Em biofábricas brasileiras, já foram registradas mais de 30% de contaminação, mesmo com todos os cuidados de assepsia (KLEIN, 2008).

3.2. Desenvolvimento *in vitro* de protocormos

Após 180 dias, todos os tratamentos já haviam formado plântulas, inicialmente desenvolvendo apenas folhas primárias verdes e, após, o desenvolvimento das raízes. Os tratamentos que tiveram melhor média de desenvolvimento de plântulas foram os tratamentos T2 (MS+CA), T4 ($\frac{1}{2}$ MS com CA) e T1 (MS) apresentando valores médios maiores (Tabela 2). O tratamento T3 ($\frac{1}{2}$ MS) apesar de apresentar considerável altura média, nº de folhas e comprimento de folhas obteve valores médios de peso fresco e comprimento de raízes menores. O tratamento T5 (B&G®) apresentou baixo desenvolvimento dos protocormos, demonstrando

os menores valores em peso fresco e comprimento de raiz das plântulas formadas (Figura 1).

Com os resultados obtidos, pôde-se observar que os tratamentos que continham Carvão Ativado (CA) na sua composição, apresentaram resultados satisfatórios no desenvolvimento dos protocormos e formação de plântulas. De acordo com alguns autores, o efeito da adição de CA no meio nutritivo possibilita condições favoráveis ao desenvolvimento que pode diminuir a adsorção de compostos tóxicos que podem ser inibidores de crescimento, além desse componente ser eficiente na adsorção de nutrientes que será disponibilizado de forma lenta para a planta em desenvolvimento (GUSON; MORAES; RONCONI, 2012).

Tabela 2. Desenvolvimento de plântulas de *Epidendrum carpophorum* *in vitro* em diferentes meios de cultura com 180 dias.

Tratamentos	Altura Média (cm)	Peso fresco médio (g)	Média Nº Folhas	Comprimento Médio Folha (cm)	Média Nº Raiz	Comprimento Médio Raiz (cm)
T1 (MS)	0,50	0,015	3,2	1,08	1,2	0,58
T2 (MS+ CA)	0,34	0,038	4,2	1,30	1,2	0,40
T3 (½ MS)	0,20	0,000	2,2	0,32	0,0	0,00
T4 (½ MS +CA)	0,38	0,014	5,0	0,94	0,8	0,12
T5 (B&G®)	0,12	0,000	2,4	0,24	0,0	0,00



Figura 1. Plântulas de *Epidendrum carpophorum* germinadas *in vitro* em diferentes tratamentos com 180 dias.

4 CONCLUSÃO

- A espécie *Epidendrum carpophorum* possui germinação rápida apresentando resultados satisfatórios quando cultivados em meio MS e ½ MS sem carvão ativado;
- Para o desenvolvimento de protocormos *in vitro* e formação de plântulas obteve-se melhores resultados nos meios com MS completo.
- O meio comercial B&G® não é adequado a germinação e desenvolvimento da espécie;
- No geral, o uso de carvão ativado promoveu bom desenvolvimento de plântulas;
- Recomenda-se mais estudos com a espécie estudada para complementar na formação de um protocolo eficiente para a sua propagação *in vitro*;

REFERÊNCIAS

BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.;

AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20046>>. Acesso em: 02 mar. 2023.

SUZUKI, Rogério Mamoru; MOREIRA, Vania Carolina; NAKABASHI, Myna; FERREIRA, Wagner de Melo. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 657-666, 2009.

GUSON, R. R.; MORAES, C. P. de; RONCONI, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* Hook. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, [s. l], v. 5, n. 3, p. 551-563, 06 fev. 2012.

HINSLEY, Amy; BOER, Hugo J de; FAY, Michael F; GALE, Stephan W; GARDINER, Lauren M; GUNASEKARA, Rajasinghe s; KUMAR, Pankaj; MASTERS, Susanne; METUSALA, Destario; ROBERTS, David L. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. **Botanical Journal Of The Linnean Society**, [S.L.], v. 186, n. 4, p. 435-455, 13 dez. 2017.

KOCH, Ana Kelly; SANTOS, João Ubiratan Moreira dos; ILKIU-BORGES, Anna Luiza. Sinopse das Orchidaceae holoepífitas e hemiepífitas da Floresta Nacional de Caxiuanã, PA, Brasil. **Hoehnea**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 129-148, mar. 2014.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no estado do Rio de Janeiro**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 13 mar. 2023.

SILVA, Carlos de Sousa; ARAÚJO, Leila Garcês de; SOUSA, Kellen Cristhina Inácio; CARVALHO, Jacqueline Campos Borba de; GONÇALVES, Letícia de Almeida; CARNEIRO, Luciano Lajovic. Cultivo *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) ocorrente no Cerrado da região Centro-Oeste. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 1083-1091, dez. 2016.

SILVA, J.B.F. & M.F.F. SILVA, 2010. **Orquídeas Nativas da Amazônia Brasileira**. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 518 pp.

SCHNEIDERS, Danieli; PESCADOR, Rosete; BOOZ, Maristela Raitz; SUZUKI, Rogério Mamoru. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 185-191, abr. 2012.