

Germinação *in vitro* de gongora (Orchidaceae) em meios nutritivos simplificados

In vitro germination of gongora (Orchidaceae) in simplified nutrient media

Lais Tomaz Ferreira^{1*}, Natália Corte Real¹, João Alves Ferreira Pereira², Cláudia Ulisses¹, Lilia Willadino¹

RESUMO

A espécie de orquídea *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón é uma das 25 espécies pertencentes a este gênero amplamente cultivado, mas a propagação apresenta limitações devido à baixa produção de brotações e a ineficiência de germinação das sementes. Como alternativa de minimizar os custos da produção e aumentar a oferta de mudas *in vitro*, realizou-se a semeadura *in vitro* da espécie *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón em distintos meios nutritivos compostos por nutrientes de fácil acesso no mercado interno e com custos reduzidos para a produção de plantas. As sementes foram inoculadas nos tratamentos: (T1) NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio: 20:10:30) + água de coco (meio semissólido); (T2) NPK + água de coco (meio líquido); (T3) NPK (meio semissólido); (T4) NPK (meio líquido) e (T5) ½ MS (meio semissólido) - controle. Aos 90 dias observou-se que o melhor tratamento foi o meio semissólido com o fertilizante comercial NPK, o qual não diferiu estatisticamente do tratamento controle. Nestes foram observados menores percentuais de necrose e oxidação das sementes e conseqüentemente o maior percentual de formação de plântulas. A utilização do meio nutritivo NPK permitirá maior facilidade em adquirir reagentes necessários ao desenvolvimento da planta *in vitro*, bem como uma redução nos custos de produção.

Termos para indexação: *Gongora quinquenervis*, Água de coco, NPK.

ABSTRACT

The orchid *Gongora quinquenervis* Ruiz Pavón is one of 25 species belonging to this genus widely grown, but the spread presents limitations due to low production of budding and the inefficiency of seed germination. Alternatively to minimize the costs of producing seedlings *in vitro* and increase the supply of seedlings, *in vitro* of the sowing species *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón was performed in different nutrient media composed of nutrients of easy access within the internal market and with reduced costs for the production of plants. The seeds were inoculated in the following treatments: (T1) NPK (Nitrogen, phosphorus and potassium: 20:10:30) coconut water (semisolid); (T2) NPK coconut water (liquid); (T3) (medium semisolid); (T4) NPK (liquid) and (T5) half MS (medium semisolid)-control. The 90 days it was observed that the best treatment was the medium semisolid with commercial fertilizer NPK, which did not differ statistically from the control treatment. Smaller percentages of necrosis and seed necrosis were observed and consequently the highest percentage of seedling formation. The use of the NPK nutrient medium will allow higher ease in acquiring reagents required for the *in vitro* plant, development as well as a reduction in the production costs.

Index terms: *Gongora quinquenervis*, coconut water, NPK.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae, é uma das maiores famílias da divisão Angiospermae, formada por cerca de 900 gêneros e aproximadamente 27.135 espécies (Zotz et al., 2013), sendo 200 gêneros e 2.500 espécies encontradas no Brasil (Campos, 2008), porém, muitas dessas espécies estão correndo risco de extinção, devido a constantes coletas indiscriminadas, retirando-as de seus habitats (Mahendran et al., 2013). A espécie *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón trata-se de uma espécie epífita e apresenta inflorescência

racemosa, multiflora e muito perfumada (Martini et al., 2001)

O setor de produção de flores tem aumentado no Brasil durante os últimos anos e atingiu importância significativa no mercado internacional (Lima Júnior et al., 2015). Dentre as plantas ornamentais mais comercializadas, destacam-se as orquídeas, mas a propagação convencional tanto assexual quanto sexual é limitada, devido respectivamente, à baixa produção de brotações e a ineficiência de germinação das sementes. A semente de orquídea é desprovida de cotilédono e

Recebido em 24 de agosto de 2015 e aprovado em 5 de maio de 2016

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Recife, PE

²Universidade Federal do Ceará/ufc, Fortaleza, CE

*Autor para correspondência: laistomazpe@hotmail.com

em algumas espécies não apresentam endosperma ou quando presentes é extremamente insuficiente para oferecer os nutrientes necessários ao embrião durante o processo de germinação (Ferreira et al., 2010). Portanto, para haver germinação naturalmente é necessária a associação de fungos micorrízicos com as sementes dessas plantas (Roberts e Dickson, 2008).

Knudson (1992) propôs a germinação assimbiótica das sementes de *Cattleya mossiae* em meio nutritivo relativamente simples, composto de alguns sais minerais e açúcar. A partir de então, esta metodologia tornou-se uma das principais ferramentas para a propagação comercial de orquídeas (Galdiano Junior et al., 2012), tornando-se uma técnica interessante para a propagação e conservação de germoplasma desta espécie (Paiva Neto et al., 2013; Villa et al., 2014), promovendo o controle sobre os fatores nutricionais e maiores percentuais de germinação, comparado a germinação em condições naturais, obtendo grande número de indivíduos em espaço físico, tempo e custos reduzidos, sendo uma importante alternativa para produção em larga escala (Rodrigues et al., 2012).

A composição do meio nutritivo é essencial para o desenvolvimento do explante, pois concentra os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com a necessidade nutricional de cada espécie (Villa et al., 2014). Geralmente utiliza-se como meio nutritivo padrão o MS (Murashige e Skoog, 1962), composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e sacarose (Su et al., 2012), podendo ser adicionado compostos orgânicos, como a água de coco, ao meio nutritivo. A água de coco *in natura* geralmente é fonte de aminoácidos, vitaminas, sais minerais e reguladores de crescimento, tendo uma constituição média de 93% de água, 7% de açúcares, sais minerais, proteínas, vitaminas, e a cada 100 mL de água de coco contém 4,4 g de glicose; 0,37 mg de proteínas; 6,2 mg de fósforo; 175 mg de potássio; 17,5 mg de cálcio; 8,5 mg de magnésio; 10,5 mg de sódio; 0,06 mg de ferro e 57 mg de vitamina C. Devido a essa composição, a água de coco proporciona o enriquecimento do meio de cultura, promovendo a germinação, crescimento

e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (Soares et al., 2013).

Os meio MS (Murashige e Skoog, 1962) completo e com a metade da concentração dos sais minerais, promovem o desenvolvimento dos híbridos *Cattleya violacea* estriata Pedrinho x *Cattleya violacea* Pedrinho e *Cattleya violacea* Pedrinho x *Cattleya violacea* H21/06-142 (Melo et al., 2015). Enquanto que Menezes et al. (2015) sugerem o meio a base do adubo B & G acrescido de suco de tomate e carvão ativado para o cultivo de *Cattleya violacea*, pois admitem que o meio simplificado, constituído de fertilizante comercial, utiliza reagentes de fácil acesso no mercado e em quantidade reduzida. Além da facilidade do preparo e do reduzido custo dos componentes utilizados, este tipo de meio nutritivo apresenta uma condição favorável que é a ausência de compostos, como nitrato de amônio e de potássio presentes no meio MS, cuja aquisição é controlada pelo Ministério de Defesa, que consta em Lei Federal nº 3665, de 20 de novembro de 2000 (Brasil, 2000), o que dificulta o processo de compra. Segundo Galdiano Junior et al. (2012), meio simplificado com o fertilizante Peters® (NPK 10-30-20) demonstrou ser eficiente no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya trianaei*, apresentando custo reduzido de produção em relação ao meio MS.

Diante do exposto, buscou-se avaliar a germinação *in vitro* de *Gongora quinquenervis* em diferentes meios nutritivos simplificados, com a finalidade de obter plantas com qualidade fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas de *Gongora quinquenervis* foram submetidas a uma lavagem com detergente comercial e enxaguadas em água corrente por cinco minutos. Após a lavagem, as cápsulas foram levadas para câmara de fluxo laminar e foram imersas em álcool 70% em frasco de vidro com capacidade para 350 mL por um minuto e posteriormente submetidas à assepsia com hipoclorito de cálcio (CaCl_2O_2) 3%. Os frascos contendo as cápsulas imersas no hipoclorito foram fechados e levados para um shaker orbital de

bancada, onde ficaram sob agitação por 30 minutos. Em seguida realizou-se o enxágue com tríplex lavagem em água destilada deionizada esterilizada em câmara de fluxo laminar. Após a assepsia, a cápsula foi aberta com auxílio de pinça e bisturi e as sementes foram retiradas da cápsula e imersas em 55 mL de água destilada deionizada esterilizada. Com uma seringa foram retirados 5 mL de água contendo as sementes em suspensão, sendo as mesmas inoculadas nos seus respectivos tratamentos (Tabela 1):

O fertilizante solúvel Kristalon[®] tem a seguinte composição: 3% de N, 11% de P₂O₅, 38% de K₂O, 4% de MgO, 11% de S, 0,025% de B, 0,004% de MO, 0,01% de Cu-EDTA, e 0,025% de Zn-EDTA, 0,07% Fe-EDTA, 0,04% Mn-EDTA, enquanto o Barco Viking[®] apresenta 15,5% de N e 19% de Ca. Os constituintes dos fertilizantes foram dissolvidos em água deionizada para o preparo do meio nutritivo.

O pH dos meios nutritivos foram ajustados para 5,8 e em seguida autoclavado a 121 °C por 20 min. Os meios semissólidos foram gelificados com 6,5 g.L⁻¹ de ágar.

As sementes, em suspensão, foram acondicionadas em frascos de vidro contendo 30 mL de meio nutritivo dos respectivos tratamentos, mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 90 dias. Nos frascos contendo o meio líquido foi colocada uma ponte de papel filtro como suporte para apoiar as sementes/ explantes. Foram analisadas as seguintes variáveis: percentagem de germinação, oxidação, necrose e número de plântulas

formadas. O percentual de germinação foi feito a partir da contagem dos protocormos formados, o de oxidação realizou a contagem dos explantes escurecidos e o de necrose contabilizou-se os protocormos necrosados e quanto ao número de plântulas formadas, foi feita a contagem daquelas que apresentavam raiz com os primórdios foliares expandidos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 10 repetições por tratamento, onde cada repetição era composta por um frasco contendo 5 mL de água contendo as sementes em suspensão. Os dados foram transformados utilizando a fórmula $\sqrt{x+0,5}$ e posteriormente foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (Silva, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma maneira geral o início da germinação, em todos os tratamentos, ocorreu em torno de 60 dias após a inoculação, sendo indicada pela formação dos protocormos (Figure 1A-B). Os tratamentos T3 (NPK semissólido) e T5 (½ MS semissólido) não diferiram estatisticamente, apresentando mais de 90% de germinação (Tabela 2). Menezes et. al., (2015) alcançaram melhores resultados na germinação e crescimento inicial de plântulas *in vitro* de *Cattleya violaceae* Rolfe em meio à base do adubo B & G acrescidos de 100 ml L⁻¹ de suco de tomate e 2g L⁻¹ de carvão ativado, comparado ao meio

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos utilizados na germinação da orquídea *Gongora quinquenervis*.

Tratamentos	Meio de Cultura	Descrição
T1	NPK + água de coco (semissólido)	Fertilizante solúvel Kristalon [®] (742,86 mg L ⁻¹), Barco Viking [®] (840 mg L ⁻¹), 100 ml L ⁻¹ de água de coco (Marca Sococo), vitaminas do meio MS e 30g L ⁻¹ de sacarose.
T2	NPK + água de coco (líquido)	Fertilizante solúvel Kristalon [®] (742,86 mg L ⁻¹), Barco Viking [®] (840 mg L ⁻¹), 100 ml L ⁻¹ de água de coco (Marca Sococo), vitaminas do meio MS e 30g L ⁻¹ de sacarose.
T3	NPK (semissólido)	Fertilizante solúvel Kristalon [®] (742,86 mg L ⁻¹), Barco Viking [®] (840 mg L ⁻¹), vitaminas do meio MS, 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol e 30g L ⁻¹ de sacarose.
T4	NPK (líquido)	Fertilizante solúvel Kristalon [®] (742,86 mg L ⁻¹), Barco Viking [®] (840 mg L ⁻¹), vitaminas do meio MS, 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol e 30g L ⁻¹ de sacarose.
T5	½ MS (semissólido)	Metade da concentração dos sais MS, vitaminas do meio MS, 100 mg L ⁻¹ de mio-inositol e 30g L ⁻¹ de sacarose.

Knudson C. Já a espécie *Schomburgkia gloriosa* desenvolveu melhor no meio ½ MS do que nos meios contendo fertilizante comercial Hyponex® e Kristalon laranja. (Dezan et al., 2012). Sendo assim, o regime de nutriente para a cultura das orquídeas é espécie - específica e não há meio nutritivo único aplicável a todas as espécies de orquídeas (Galdiano Junior et al., 2012; Mahendran et al., 2013).

A consistência do meio nutritivo é uma variável determinante para o desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies vegetais como orquídeas, gérberas e bromélias (Murashige, 1974). Os meios líquidos não foram eficientes para o desenvolvimento das plantas de *Gongora quinquenervis*, apresentando baixas taxas de germinação e altas taxas de oxidação e necrose (Tabela 2), concluindo-se que a ponte de papel não foi eficiente no processo de germinação, e a causa pode está relacionada com a submersão das sementes causando baixa concentração de oxigênio. Em contraste com o comportamento da *Gongora quinquenervis*, a propagação *in vitro* de *Oncidium baueri*, apresentou melhores resultados quando cultivada em meio líquido com suporte de espuma de poliuretano picada (Faria et al., 2006). O uso de ágar de boa qualidade onera os custos finais da produção de mudas em larga escala (Gallo et al., 2015), pois o custo do ágar com maior grau de pureza fica em torno de R\$ 6,25 por litro, enquanto o papel filtro fica em torno de R\$ 0,045.

O meio NPK (semissólido) (T3) e ½ MS (semissólido) (T5), não diferiram quanto o número de plantas formadas, apresentando o maior número de plântulas (Tabela 2; Figura 1 C e E), enquanto os meios T1, T2 e T4 apresentaram

baixa capacidade de formação de plântulas, pois a maioria dos protocormos formados apresentaram alto percentual de necrose, impedindo seu desenvolvimento em plântulas (Tabela 2; Figura 1 A, B e D).

A adição de água de coco ao meio nutritivo resultou, por sua vez, em um baixo número de plântulas formadas (Tabela 2). Ainda que a água de coco contenha elevadas concentrações de glicose, frutose, sais minerais e hormônios e estimule o crescimento de outros gêneros de orquídeas (Soares et al., 2013), não favoreceu a germinação e o desenvolvimento da espécie *Gongora quinquenervis*. Isto pode ter ocorrido pela falta de inositol no meio dos tratamentos com água de coco, o qual desempenha papel importante no crescimento *in vitro* (Quisen e Angelo, 2008), e/ou a utilização de água de coco industrializada (Sococo LTDA). Embora que a água de coco não influenciou na germinação e no número de plântulas de *Dendrobium noblie* (Soares et al., 2013).

Os valores monetários dos componentes do meio de cultura podem ser elevados na produção de plântulas *in vitro* em larga escala (Gallo et al., 2014), portanto o intuito da troca dos macro e micronutrientes do meio MS por fertilizantes é uma forma de economizar e facilitar a compra de reagentes para a produção do meio nutritivo, tornando-o mais simples e mais econômico. Para produção de 1 litro de meio nutritivo contendo os macronutrientes e os micronutrientes do meio MS, se faz necessário um custo aproximado de R\$ 1,85, enquanto que a utilização dos fertilizantes (meio nutritivo simplificado) tem um custo de apenas R\$ 0,006, totalizando uma economia de 99% por litro de meio.

Tabela 2 – Porcentagem de germinação, oxidação, necrose das sementes e formação de plântulas aos 90 dias da germinação de orquídea *Gongora quinquenervis* em meios nutritivos simplificados.

Tratamentos	Germinação (%)	Oxidação (%)	Necrose (%)	Número de plântulas formadas
T1 - NPK + água de coco (semissólido)	35,0 b	80,0 a	20,0 ab	9 b
T2 - NPK + água de coco (líquido)	30,0 b	56,7 ab	43,3 ab	6 b
T3 - NPK (semissólido)	92,5 a	15,0 c	25,0 ab	95 a
T4 - NPK (líquido)	9,0 b	38,0 bc	62,0 a	8 b
T5 - ½ MS (semissólido)	99,0 a	14,0 c	23,0 ab	100 a

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

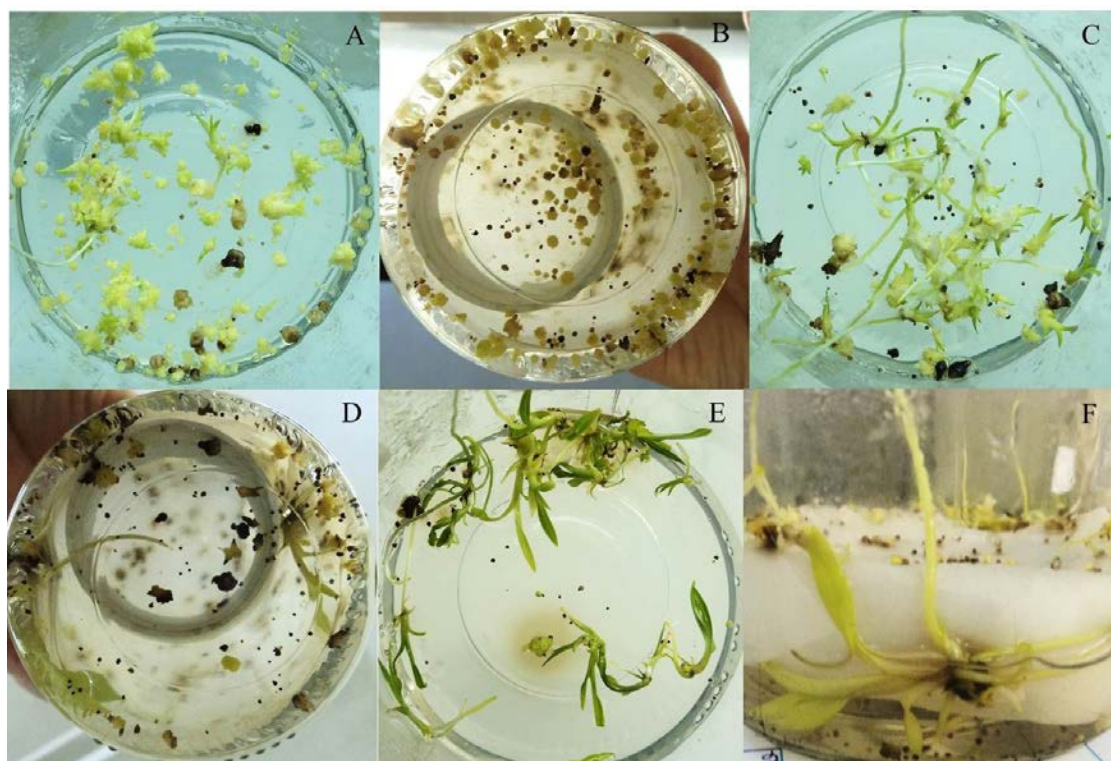


Figura 1 - Desenvolvimento de sementes de *Gongora quinquenervis* (A) T1: NPK + água de coco (semissólido); (B) T2: NPK + água de coco (líquido); (C) T3: NPK semissólido; (D) T4: NPK líquido; (E) T5: Controle: ½ MS semissólido; (F) Planta desenvolvida com 90 dias após a semeadura *in vitro*.

CONCLUSÃO

O cultivo assimbiótico de *Gongora quinquenervis* em meio semissólido simplificado foi tão eficiente quanto ao cultivo em meio MS, com metade da concentração dos sais minerais, considerado o meio padrão para cultivo.

AGRADECIMENTO

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB – FUNDECI) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. P. et al. Influência da poda radicial e recipientes na aclimatização *ex vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, 11(4):414-418, 2013.
- BRASIL. Ministério da Defesa. **Decreto-Lei n. 3665, de 20 de novembro de 2000**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3665.htm >. Acesso em: 18 out. 2011.
- CAMPOS, F. A. D. B. Considerações sobre a Família Orquidacea: Taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia. *Mundo saúde*, 32(3):383-392, 2008.
- DEZAN, L. F. et al. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificado. *Idesia*, 30(2):53-58, 2012.
- FARIA, R. T. et al. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 28(1):7174, 2006.
- FERREIRA, A. W. C. et al. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 24(3):636-639, 2010.
- GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. *Comunicata Scientiae*, 3(3):210-214, 2012.

- GALLO, F. R.; KUHN, B. C.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii* (Orchidaceae) sobre suportes alternativos ao ágar. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, 9(3):17-22, 2014.
- HERMANN, M. H.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, 17(1-4):162-166, 2011.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, 73(1):1-25, 1992.
- NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. (Org.) **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. São Paulo, SP: OCESP, 2015. 132p.
- MAHENDRAN, G. Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. **Acta Physiologiae Plantarum**, 35:829-840, 2013.
- MELO, G. M. et al. Germinação assimiótica do gênero *Cattleya* em diferentes meios nutritivos. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 11(1):19-26, 2015.
- MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36(10):1319-1324, 2001.
- MENEZES, C. A. S. et al. Germinação e desenvolvimento de *Cattleya violaceae* Rolfe *in vitro* em meios de cultura alternativos. **Enciclopédia Biosfera**, 11(21):1140-1148, 2015.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, 25:135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(1):9-14, 2008.
- PAIVA NETO, V. B. *In vitro* behaviour of *Aspasia variegata*, an epiphytic orchid from the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, 43(12):2178-2184, 2013.
- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. 61. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008, 44p.
- ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, 18:325-329, 2008.
- RODRIGUES, M. et al. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 48(1): 67-72, 2012.
- SILVA, F. A. S. **Assistat**. Versão 7.7 beta (2014). DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em <<http://www.assistat.com/>>. Acessado em: 20 de maio de 2014.
- SOARES J. S. et al. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, 31:63-67, 2013.
- SU, M. J.; RIBEIRO, J. A. S.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, 40(1):28-34, 2012.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina: Ciências Agrárias**, 35(2):683-694, 2014.
- ZOTZ, G. The systematic distribution of vascular epiphytes—a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 171(3):453-481, 2013.

