

Avaliação da germinação assimbiótica de *Cyrtopodium withneri* L.C. Menezes (Orchidaceae) em três meios de cultura e a influência do carvão ativado.

Lima, J.H¹, Soares-Silva, L.H²

1. Aluno de doutorado em Botânica da Universidade de Brasília-DF, jhlmacoffeholic@gmail.com

2. Docente do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília, lselena71@gmail.com

Resumo: *Cyrtopodium*, com 48 espécies, é um dos gêneros de distribuição mais ampla da família Orchidaceae nas Américas. É encontrado desde o sul da Flórida até a Argentina, com maior diversidade na região *core* do Cerrado, o Planalto Central brasileiro. Plantas desse gênero são usadas principalmente como medicinais, apesar do potencial ornamental. Uma das espécies que se destaca por esse potencial é *Cyrtopodium withneri*. Endêmica do Cerrado brasileiro, possui longas inflorescências com flores amarelo-vibrantes, e é adaptada à seca, possuindo baixa demanda hídrica. Há poucos estudos sobre a propagação de espécies deste gênero, e nenhum sobre esta espécie. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a germinação assimbiótica de *C. withneri* em três meios de cultura: KC (Knudson C), MS (Murashige & Skoog) e ½ MS, com e sem adição de carvão ativado. Os dados obtidos mostraram que KC e ½ MS, adicionados de carvão ativado, apresentaram as maiores percentagens de germinação, embora com alta mortalidade de protocormos no meio KC com carvão. O meio MS sem adição de carvão foi o menos efetivo.

Palavras-chave: carvão ativado, *Cyrtopodium*, germinação, Orchidaceae

Evaluation of asymbiotic germination of *Cyrtopodium withneri* L.C. Menezes (Orchidaceae) in three culture media and de influence os activated charcoal.

Abstract: *Cyrtopodium*, with 48 species, is one of the most widely distributed genera of the Orchidaceae family in the Americas. It is found from south Florida to Argentina, with greater diversity in the core region of the Cerrado, the Brazilian Central Plateau. Plants of this genus are mainly used as medicinal plants, despite their ornamental potential. One of the species that stands out for this potential is *Cyrtopodium withneri*. Endemic to the Brazilian Cerrado, it has long inflorescences with vibrant yellow flowers, and is adapted to drought, having low water demand. There are few studies on the propagation of species of this genus, and none on this species. Thus, this study was carried out to evaluate the asymbiotic germination of *C. withneri* in three culture media: KC (Knudson C), MS (Murashige & Skoog) and ½ MS, with and without the addition of activated charcoal. The data obtained showed that KC and ½ MS, added with activated charcoal, presented the highest percentages of germination, although with high mortality of protocorms in the KC medium with charcoal. MS medium without added charcoal was the least effective.

Key words: activated charcoal, *Cyrtopodium*, germination, Orchidaceae

Introdução: Orchidaceae possui distribuição cosmopolita, não sendo encontrada apenas na Antártica (Dressler 1981). A família conta com 27.801 espécies, superada apenas por Asteraceae com 32.913 espécies (The Plant List 2013). Nas Américas ocorre o gênero *Cyrtopodium*, com cerca de 48 espécies distribuídas desde o sul da Flórida até a Argentina (The Plant List 2013). O Brasil é o centro de diversidade do gênero (Romero-González *et al.* 2008), possuindo 39 espécies, das quais 33 ocorrem no Cerrado, sendo 15 endêmicas do bioma (Flora do Brasil 2020). Os estudos sobre o gênero são voltados principalmente para uso medicinal (Silva *et al.* 2013), apesar do potencial ornamental (Hunhoff *et al.* 2016), com possível emprego no paisagismo, devido à baixa demanda hídrica, resistência à seca e até a incêndios sazonais (Menezes 2000). Uma espécie com tais características é *Cyrtopodium withneri* L.C. Menezes, endêmica do Cerrado brasileiro (Goiás, NW de Minas Gerais e Distrito Federal), vegetando exclusivamente como rupícola sobre afloramentos rochosos calcários, associados a vegetação

de Floresta Estacional Decidual (Batista & Bianchetti 2020). Os indivíduos apresentam longos pseudobulbos epigeos (60-80 cm), inflorescências compridas (80-110 cm), flores amarelas (Menezes 2000; Batista & Bianchetti 2020), que surgem no período seco (julho a outubro), características desejáveis, especialmente no paisagismo de jardins com baixo consumo de água – “xeriscape” (Wade *et al.* 2002).

Devido sua relação micotrófica obrigatória, sementes de orquídeas só germinam na natureza se estiverem associadas a fungos micorrizas (Dressler 1981). A produção comercial por sementes se inicia sob condições assépticas em laboratórios (Carvalho *et al.* 2013). Para isso são usados diversos meios de cultura, sendo os mais comuns KC (Knudson C) e MS (Murashige & Skoog) (Arditti 2008). Estes meios diferem entre si, principalmente, na relação de íons amônio e nitrato em suas composições (Ferreira *et al.* 2018). De acordo com Srivastava *et al.* (2015), a capacidade de metabolizar íons amônio ou nitrato varia consideravelmente entre as espécies de orquídeas, afetando sua germinação e desenvolvimento *in vitro*. Além do nitrogênio, outro componente que pode influenciar a germinação assimbiótica de orquídeas é o carvão ativado (Thomas 2008). Assim, este estudo avaliou a germinação assimbiótica de sementes de *C. withneri* em três meios de cultura: KC, MS e ½ MS, com e sem adição de carvão ativado.

Material e métodos

Foram testados três tipos de meios de cultura: KC (Knudson C), MS (Murashige e Skoog) na concentração padrão e com metade dos nutrientes (½ MS), adicionados de 20 g/L de sacarose, na presença e ausência de 3 g/L de carvão ativado e gelificado com 7 g/L de ágar (Rodrigues *et al.* 2015). O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de ágar e esterilização em autoclave (121 °C por 20 minutos). Após isso, placas de Petri de 90 x 15 mm receberam 30 mL de meio. A desinfestação das sementes foi feita em microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de hipoclorito de sódio a 0,4 % por cinco minutos, seguido de descarte da solução e tripla lavagem em água destilada (Alvarez-Pardo *et al.* 2006). Cada tratamento consistiu de 20 mg de sementes desinfestadas distribuídas em três placas com auxílio de uma alça para inoculação bacteriológica (Dutra *et al.* 2009). As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas em sala de vegetação com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de 25 ± 2 °C (Rodrigues *et al.* 2015).

Após 90 dias foi realizada a avaliação da germinação. A contagem de sementes foi feita com metodologia adaptada de Dutra *et al.* (2009) e Hosomi *et al.* (2017). Foram demarcados 16 campos de 1 x 1 cm no centro da placa, e cinco campos foram sorteados com emprego da função “ALEATORIOENTRE” do software Microsoft Excel®. Foram consideradas germinadas as sementes com embrião intumescido, clorofilado com ou sem rompimento da testa (Yamazaki & Miyoshi 2006).

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos do CRAD/UnB (Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas da Universidade de Brasília-DF). As percentagens foram transformadas para valores angulares ($\arccos(\sqrt{x}/100)$), e submetidos a análise de variância (ANOVA), e comparação das médias pelo teste Tukey a 5 % de significância, ambas no software SISVAR (Ferreira 2011).

Resultados e Discussão

Os dados obtidos mostraram que para *Cyrtopodium withneri* os meios com maior germinabilidade, i.e., com maiores percentagens de germinação, foram KC e ½ MS com adição de carvão, sem diferença estatística entre eles (Tabela 1). O meio menos eficiente foi MS sem carvão. Os meios KC e ½ MS sem carvão não apresentaram diferença estatística em relação a MS com carvão. A mortalidade de protocormos foi elevada em todos os meios sem carvão, bem

como em KC com carvão. A maior sobrevivência de protocormos foi observada em 1/2 MS com carvão.

Tabela 1. Germinabilidade de *C. withneri* em três meios de cultura com e sem adição de carvão. Valores em porcentagem.

Carvão ativado	Meio de cultura		
	KC	MS	1/2 MS
+	99.76a	93.25b	99.71a
-	90.37b	61.8c	86.03b

Médias acompanhadas de mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente trabalho foi verificado o efeito positivo do carvão na germinação. De maneira geral o carvão ativado influencia positivamente a germinação *in vitro* de sementes de orquídeas, mas há exceções (Thomas 2008). Alguns trabalhos sobre germinação em orquídeas mostram o efeito positivo do carvão ativado, entre eles o de Schneiders *et al.* (2012) com *Cattleya forbesii* Lindl. e o de Rodrigues *et al.* (2015) com *Cyrtopodium saintelegerianum* Rchb.f. Nurfadilah (2016) ao trabalhar com *Dendrobium taurulinum* J. J. Smith., obteve os seguintes valores de germinabilidade em meios com adição vs. sem adição de carvão: KC (99,3 vs. 81,2 %), MS (96,2 vs. 87,7 %) e VW (Vacin & Went) (91,5 vs. 87,8 %). Tais dados se assemelham aos apresentados aqui, onde os meios com carvão tiveram germinabilidade superior a 90 % e KC com adição de carvão foi o meio mais eficiente.

Além do carvão ativado, a composição de sais do meio de cultura, em especial as formas de nitrogênio disponíveis, amônio ou nitrato, influencia bastante a germinação (Arditti 2008). Segundo Stewart (1989 apud Ferreira *et al.* 2018), as orquídeas se dividem em dois grupos conforme a aptidão em germinar em meios com maior concentração de: (i) amônio (NH₄⁺); e (ii) nitrato (NO₃⁻). Meios como VW e KC apresentam maior relação NH₄⁺: NO₃⁻, 1,46 e 0,89, respectivamente, enquanto que MS e P723 (PhytoTechnology Orchid Seed Sowing Medium – PhytoTechnology Laboratories®), apresentam relação de 0,52. Contudo, há espécies, como *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl., que apresentou maior germinação nos meios P723 e VW (27,3 e 26,1 %, respectivamente), quando comparado com 1/2 MS (12,9 %), KC (10,0 %) (Dutra *et al.* 2009). Como os meios P723 e VW tem relações inversas de NH₄⁺: NO₃⁻, é possível que outros fatores tenham influenciado a germinação como presença/ausência de luz, fotoperíodo, entre outros, e não as formas nitrogenadas dos meios.

Os resultados deste trabalho mostraram que a germinação de *C. withneri* foi favorecida pela adição de carvão ativado ao meio. Apesar da alta germinabilidade em KC com carvão, houve elevada mortalidade de protocormos. Assim recomenda-se o uso de meio 1/2 MS com adição de carvão ativado para a germinação de sementes desta espécie.

Referências

- Alvarez-Pardo, V.M.; Ferreira, A.G.; Nunes, V.F. 2006. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira* 24: 217-220.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of orchids*. 2ª ed. Blackwell publishing, Malden. vol. 1. Pp. 1-138.
- Batista, J.A.N.; Bianchetti, L.B. 2020. *Cyrtopodium* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB37483>>. Acesso em: 29 jul. 2021.
- Carvalho, A.C.P.P.; Tombolato, A.F.C.; Rodrigues, A.A.J.; Santos, E.O.; Silva, F. 2013. Micropropagação de orquídeas. Pp. 13-53. In: T.G. Junghans; A.S. Souza (eds.). *Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas*. 2 ed. Brasília: EMBRAPA.

- Dressler, R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press. 331 pp.
- Dutra, D.; Kane, M.E.; Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96: 235-243.
- Ferreira, D.F. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35(6):1039-1042.
- Ferreira, W.M.; Oliveira, S.P.; Suzuki, R.M.; Silva, K.L.F.; Soares Júnior, J.W.P. 2018. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) in vitro. *Rodriguésia* 69(4): 2137-2151.
- Flora do Brasil (2020) Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6361/>. Acesso em: 29 jul. 2021.
- Hosomi, S.T.; Souza, T.B.; Custódio, C.C.; Neto, N.B.M. 2017. Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. *Australian Journal of Crop Science*. <http://doi: 10.21475/ajcs.17.11.10.pne606>
- Hunhoff, V.L.; Silva, C.A.; Lage, L.A.; Krause, W.; Palú, E.G. 2016. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). *Agro@mbiente* 10(4): 358-363.
- Menezes, L.C. 2000. Orquídeas genus *Cyrtopodium*: Espécies brasileiras. IBAMA. Brasília. 208 p.
- Nurfadilah, S. 2016. The effect of culture media and activated charcoal on asymbiotic seed germination and seedling development of a threatened orchid *Dendrobium taurulinum* J.J. Smith in vitro. *Berita Biologi* 15(1): 49-57.
- Rodrigues, L.A.; Neto, V.B.P.; Boaretto, A.G.; Oliveira, J.F.; Torrezan, M.A.; Lima, S.F.; Otoni, W.C. 2015. In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 15: 10-17.
- Romero-González, G.A.; Batista, J.A.N.; Bianchetti, L.B. 2008. A synopsis of the genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: Orchidaceae). *Harvard Papers in Botany* 13(1): 189-206.
- Schneiders, D.; Pescador, R.; Booz, M.R.; Suzuki, R.M. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Revista Ceres* 59(2): 185-191.
- Silva, A.G.; Boldrini, R.F.; Kuster, R.M. 2013. Os sumarés cicatrizantes da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). *Natureza on line* 11(3): 152-154.
- Srivastava, D.; Gayatri, M.C.; Sarangi, S.K. 2015. In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. *Indian Journal of Biotechnology* 14: 574-580.
- The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org>. Accessed on 29 July 2021.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618–631.
- Wade, L.; James, T.; Coder K.D.; Landry, G.; Tyson, A. W. 2002. A guide to developing a water-wise landscape, University of Georgia Environmental Landscape Design Department, Georgia. 42p.
- Yamazaki, J.; Miyoshi, K. 2006. In vitro Asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98: 1197–1206.