

O EFEITO DE CITOCININAS NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb.F. (ORCHIDACEAE)

Lilian Americano do Brasil¹
Maria Tereza Faria²
Sérgio Tadeu Sibov³

RESUMO

São conhecidas aproximadamente 39 espécies do gênero *Cyrtopodium*, desde a Flórida até Argentina e Bolívia. Entretanto a espécie *Cyrtopodium saintlegerianum* é encontrada em uma ampla extensão geográfica brasileira abrangendo os estados do Pará, Tocantins, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal. Possui hábito epífita e, como característica das orquídeas, sementes muito pequenas e sem endosperma e uma pequena quantidade de energia contida no embrião, dificultando assim o processo de germinação. Muitas espécies estão em risco de extinção devido ao extrativismo predatório e as alterações antrópicas nos ecossistemas o que leva a modificações em seu habitat. Devido a esses fatores, cria-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas de propagação que permitam um maior número de plantas, sadias, uniformes, em curto período de tempo e espaço diminuto. Estas técnicas podem ser encontradas na Cultura de Tecidos de Plantas. Objetivou-se, com este trabalho avaliar o efeito de duas citocininas, 6-benzilaminopurina (BAP) e netina (KIN), no desenvolvimento de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* obtidas *in vitro*, a fim de estabelecer o melhor meio nutritivo para a indução de novos brotos e desenvolvimento de plântulas. Utilizou-se nos experimentos o meio MS adicionado com vitaminas, inositol, sacarose e combinações de BAP ou KIN nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 25 frascos por tratamento e cada frasco contendo cinco plântulas.

Palavras Chave: micropropagação, epífitas, cultura de tecidos, protocolo.

INTRODUÇÃO

As Orchidaceae são uma das maiores famílias entre as angiospermas, compreendendo 35 mil espécies incluindo híbridos (DRESSLER, 1993). Apresenta distribuição cosmopolita, porém a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais (CHRISTENSON, 2004).

No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies (COLOMBO *et al.*, 2004) sendo que 500 ocorrem no Cerrado (BATISTA *et al.*, 2010). Muitas estão ameaçadas de extinção, devido à destruição de seu habitat e às coletas predatórias. O Brasil é o terceiro país mais rico em espécies, depois da Colômbia e do Equador (BARROS *et al.*, 1996).

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. De acordo com FARIA (2005), as orquídeas apresentam

¹Aluna do curso de Ciências Biológicas – Licenciatura – Faculdade Araguaia.

²Professora Titular do curso de Ciências Biológicas - Faculdade Araguaia. e-mail - hyptissp@yahoo.com.br.

³Professor Adjunto de Genética da Universidade Federal de Goiás

numerosa variabilidade de cores, aromas e tamanhos. A importância econômica das orquídeas está em crescente utilização de projetos paisagísticos devido à beleza de suas flores, resistência e praticidade no manuseio, além de formar um micro-habitat para diversos grupos de organismos.

Cyrtopodium é um gênero das regiões Neotropical com cerca de 39 espécies distribuídas do sul da Flórida (E.U.A.) ao norte da Argentina. O centro de diversidade do gênero é o Cerrado brasileiro, onde ocorrem ao menos 39 espécies (BATISTA & BIANCHETTI, 2001). A maioria das espécies do gênero são terrestres. Entretanto encontram-se também espécies paludícolas, rupícolas e epífitas.

Além da importância ornamental, plantas do gênero *Cyrtopodium* são usadas para fins medicinais na cicatrização de lesões e estancamento do sangue em cortes e feridas. Dela se produz também uma pomada utilizada no tratamento do terçol. Em Goiás, a goma extraída de seus pseudobulbos, serve para encerrar os liços dos teares primitivos feitos de fios de algodão. (MENEZES, 2000). Muitas pessoas utilizam *Cyrtopodium punctatum* para tratamento de coqueluche e tosse (VIEIRA, 2000).

Entre as espécies mais robustas e ornamentais deste gênero, temos *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb.f., que, com sua grande inflorescência amarela e marrom, está presente em ampla área geográfica brasileira abrangendo os estados do Pará, Tocantins, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Minas Gérias (BARROS et al.,2010). Esta espécie é uma das poucas epífitas no gênero. Segundo KERSTEN (2006), devido à dependência da umidade e do substrato arbóreo, a diversidade de epífitas é um indicador ecológico da qualidade ambiental.

De acordo com CHASE & HILLS (1992), espécies do gênero *Cyrtopodium* não oferecem recursos aos polinizadores, atraindo abelhas *Centridini* e *Euglossini* por engano. Orquídeas polinizadas por engano, geralmente apresentam baixo sucesso reprodutivo em condições naturais, principalmente devido à baixa frequência de polinizadores efetivos (ZIMMERMAN & AIDE, 1989). Talvez este não seja o caso de *C. saintlegerianum*, pois durante acompanhamento das fases fenológicas de um grupo de plantas nas proximidades do Parque Estadual da Serra Dourada, constatou-se a ocorrência de grande número de cápsulas formadas (acima de

10 cápsulas por inflorescência) em diversas plantas sob observação (Prof. Dr. Sérgio T. Sibov, comunicação pessoal). Qual o recurso disponibilizado e o agente polinizador permanecem desconhecidos.

Técnicas de cultura de tecidos *in vitro* representam um importante conjunto de tecnologias em todas as áreas da biologia vegetal, auxiliando na compreensão dos processos da biologia do desenvolvimento e para a utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais (TORRES *et al.*,2001). Estas técnicas têm auxiliado na preservação destas espécies, tendo como uma de suas principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas.

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, para aumentar principalmente a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (STANCATO *et al.*,2001).

Processos como a obtenção de milhares de plantas pelo processo de micropropagação, de plantas homozigóticas (duplo haploides) a partir de cultura de anteras; a obtenção de híbridos interespecíficos por fusão de protoplastos, a indução de embriogênese somática, sua maturação e germinação, entre outras técnicas, tem em comum a necessidade de controlar a divisão e a diferenciação celular *in vitro*, processos esses dependentes do balanço entre hormônios vegetais, principalmente, auxinas e citocininas.

Hormônios vegetais não atuam isoladamente. A resposta final está quase sempre associada a um balanço hormonal. No caso das citocininas, elas podem promover a indução de gemas ou de raízes em cultura de tecidos, quando aplicada em proporção adequada com auxinas. Porém, o surgimento de novos brotos seria o esperado quando esta relação tende às citocininas, pois a ação deste tipo de hormônio reduz a dominância apical. Citocininas também são essenciais à indução da citocinese além de promover alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução de formação de órgãos, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos, retardamento da senescência de tecidos e órgãos e formação de cloroplastos. (KERBAUY, 2008).

Objetivou-se com este trabalho elaborar um protocolo de micropropagação de plântulas de *C. saintlegerianum* testando a diferença da

ação de dois tipos de citocininas na indução de formação de novos brotos, raízes, folhas e PLBs (Protocorm Like Bodies).



Figura 1. A- *C. saintlegerianum* sobre caule de palmeira do gênero *Acrocomia* sp. em área antropizada de Cerrado; B: inflorescência do *C. saintlegerianum*; C: Flor de *C. saintlegerianum*. (Fotos: K. C. I. Sousa, 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (LCTV-ICBI), Goiânia-GO. Utilizaram-se plântulas de *C. saintlegerianun* obtidas por germinação *in vitro* com altura de parte aérea de $0,4 \pm 0,1$ cm. O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 3% de sacarose e 0,6% de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O meio MS suplementado com as combinações de 6-benzilaminopurina (1,0; 2,0 e 4; 0 mgL⁻¹) ou 6-furfurilaminopurina.(Figura 2).

Foram utilizados 25 frascos de 200 mL por tratamento com cinco plântulas por frasco. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do Agar e autoclavados a 120°C a 1 atm. por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com luz artificial de foto período 16 horas-luz e temperatura de aproximadamente 25°C. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura, número de folhas, comprimento da maior raiz, quantidade de raízes, número de brotos e número de PLBs. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey.



Figura 2. Plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* inoculadas em meio de cultura MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e KIN (Fotos: L. A. Brasil, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos micropropagados geraram diferentes números entre si e entre tratamentos, apesar de todos serem iniciados a partir de plântulas e terem recebido iguais condições de cultivo e manipulação, quando foram feitas as avaliações.

Para a variável porcentagem de plântulas de *C. saintlegerianum* as interações significativas ($p < 0,001$) foram no meio MS, assim como o desenvolvimento radicular. Para o segmento apical, constatou-se que as interações mais significativas foram nos tratamentos de KIN 1 e KIN 2.

Essa variação, segundo CARNEIRO (1997), pode ser atribuída a mutações ocorridas naturalmente no genótipo, que ainda não se manifestaram no fenótipo e podem ser responsáveis por diferenças encontradas no desempenho das linhagens. Gemas axilares também podem não apresentar a mesma razão de multiplicação in vitro; enquanto algumas gemas apresentam maiores e mais rápido potencial de multiplicação, outras têm multiplicação lenta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). (Fig. 4).

Tabela 1. Morfogênese em plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum*, cultivado em meio MS suplementado com concentrações de BAP e KIN no período de 30 dias no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal, UFG, Goiânia, GO, 2012.

CITOCININAS	mg	ALTURA	Nº FOLHAS	COMPRIMENTO MAIOR RAÍZ	Nº RAÍZ	Nº BROTO	Nº PLB
MS	0	0,80b	2,89c	0,62a	1,52a	1,82ab	2,80a
BAP	1	0,71b	2,93c	0,28b	1,0c	1,74abc	1,73bc
	2	0,78b	3,04c	0,29b	1,15bc	1,55bc	2,62a
	4	0,85b	3,35bc	0,31b	1,0c	1,74abc	2,48a
KIN	1	1,29a	4,49a	0,29b	1,37ab	1,85ab	2,27ab
	2	1,33a	4,0ab	0,27b	1,13bc	2,10a	2,60a
	4	0,92b	2,79c	0,24b	1,16bc	1,33c	1,48c

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

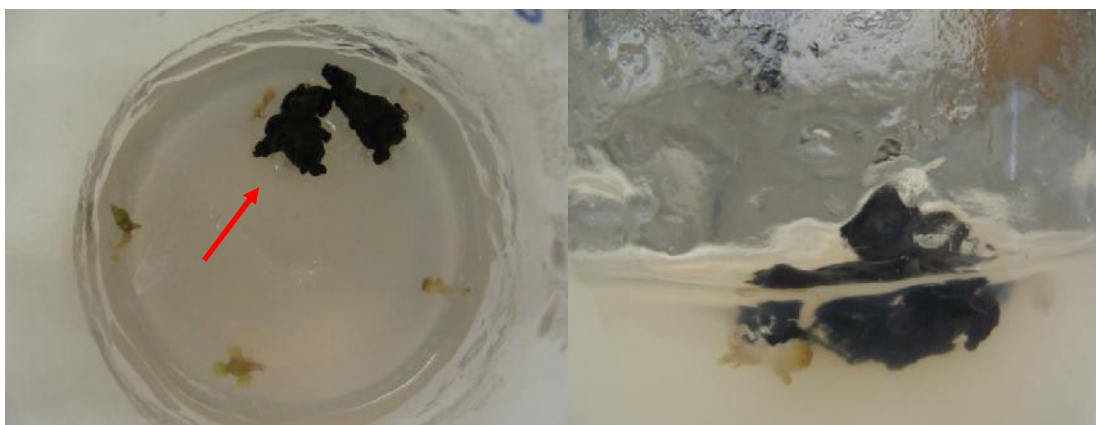


Figura 3. Contaminação do meio pelo fungo *Penicillium sp.* (Fotos: L. A. Brasil, 2012).



Figura 4. Variação das plantas de *Cyrtopodium saintlegerianum* em um mesmo meio de cultura demonstrando a variabilidade genética do gênero. (Fotos: L. A. Brasil, 2012).

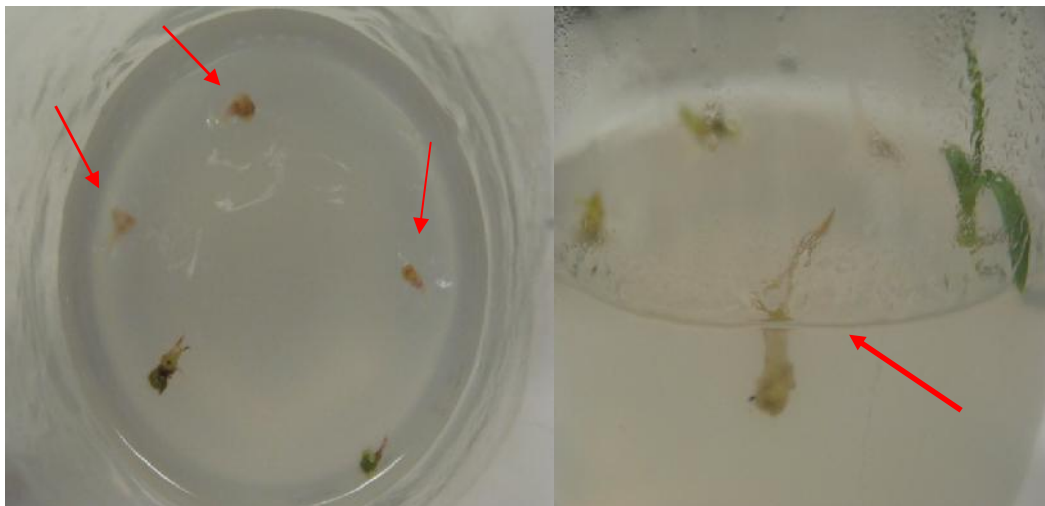


Figura 5. Plântulas permaneceram verdes por 10 dias e em seguida começaram a necrosar, chegando aos 30 dias completamente necrosados em alguns frascos. (Fotos: L. A. Brasil).

CONCLUSÃO

A resposta da citocinina KIN é superior à BAP na etapa de indução de brotação e novas folhas de *Cyrtopodium saintlegerianun*, utilizando-se plântulas produzidas *in vitro* como fonte de explante. As melhores concentrações de KIN para estes resultados foram 1,0 ou 2,0 mg/L em meio de cultura MS. Com relação ao enraizamento, a indução pode ser feita na ausência de reguladores de crescimento, mantendo o explante apenas em meio MS. A mesma conclusão foi obtida para a indução de PLBs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, F. DE VINHOS, F., RODRIGUES, V.T. BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C, N., PESSOA, E.M.. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB025908>), acesso em: 28 jun. 2012.
- BARROS, F.. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis*, e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica** 10(1): 139-151, 1996.
- BATISTA, J. A. N. & L. B. BIANCHETTI. *Cyrtopodium linearifolium* (Orchidaceae): a new species from central Brazil. *Lindleyana* 16: 226-230, 2001.
- BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B.; PELLIZZARO, K. F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, São Paulo, v. 19, n.2, p. 221-232, ago. 2005.
- CHASE, M. W. AND HILLS, H. G.. Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragranceseking - Evidence from variation in chloroplast DNA among subtribes *Catasetinae* and *Cyrtopodiinae*. *BioScience* 42: 43-49, 1992.
- CHRISTENSON, E. Orchidaceae. In: S.A. Mori; A. Henderson; D.W. Stevenson & N.H. Scott (eds.). *Flowering plants of the neotropics*. Princenton and Oxford, Princenton University Press, p. 465-468 2004.
- COLOMBO L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M. FONSECA, I.C.B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n. 2, p. 253-258, 2004.
- DRESSLER, L.R.. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland, Dioscorides, Press, 1993.
- MENEZES, L.C. Orquídeas/orchids genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras, brazilian species. Brasília: Ed. IBAMA, 2000.
- OLIVEIRA, R. L.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.27, n.1, p. 1- 5, 2005.
- STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo

de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.17, n.1, p. 25-33, 2001.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas volumes 1 e 2. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, Brasília, 2001.

VIEIRA, A. C. Estudos farmacognósticos do sumaré – *Cyrtopodium paranaense* Schltr. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 11-13, 2000.

ZIMMERMAN, J. K. AND AIDE, T. M.. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* 76: 67-73, 1989.