



## Cultivo *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) ocorrente no Cerrado da região Centro-Oeste

*In vitro* culture of *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) occurring in the Cerrado in Central-West region

Carlos de Sousa Silva<sup>1</sup>, Leila Garcês de Araújo<sup>1</sup>, Kellen Cristhina Inácio Sousa<sup>1,4</sup>,  
Jacqueline Campos Borba de Carvalho<sup>1</sup>, Leticia de Almeida Gonçalves<sup>2</sup> & Luciano Lajovic Carneiro<sup>3</sup>

### Resumo

As orquídeas podem ser propagadas *in vitro* em meios de cultivo assépticos ou em simbiose com fungos micorrízicos. *Epidendrum nocturnum* ocorre em áreas de Cerrado e neste estudo objetivou-se a visualização de fungos micorrízicos em suas raízes bem como o cultivo assimbiótico de suas plântulas em diferentes meios e a micorrização *in vitro*. No desenvolvimento assimbiótico testou-se três meios de cultura em um ensaio e, em outro ensaio, foram testadas formulações alternativas do meio Knudson C modificado, com a adição de polpa de frutas. Fungos micorrízicos de orquídeas foram usados na micorrização *in vitro*. Pelotons foram visualizados nas raízes de *E. nocturnum*. O meio Knudson C modificado diferiu estatisticamente dos demais, nas duas intensidades luminosas, no primeiro ensaio. No segundo ensaio, após sete meses, os meios com formulação alternativa não diferiram estatisticamente entre si. Na micorrização *in vitro* as plântulas com o isolado fúngico En07 (*Waitea circinata*) apresentaram maior vigor visual em relação aos demais tratamentos, mas não houve diferença estatística com o controle. Os meios com formulação alternativa e o Knudson C modificado podem ser utilizados no desenvolvimento *in vitro* de *E. nocturnum* e o isolado En07 pode ser usado na micorrização visando estratégias de conservação desta orquídea.

**Palavras-chave:** orquídea, desenvolvimento assimbiótico, micorrização, fungo.

### Abstract

Orchids can be propagated *in vitro* in aseptic culture media or in symbiosis with mycorrhizal fungi. *Epidendrum nocturnum* occurs in areas of Cerrado and this study aimed to mycorrhizal fungi visualization in their roots and its asymbiotic growing their seedlings in different media and *in vitro* mycorrhization. In asymbiotic development was tested three culture in a test and, another test, alternative formulations of medium Knudson C modified with addition of fruit pulp. Mycorrhizal fungi orchids were used in *in vitro* mycorrhization. Pelotons were visualized in the roots of *E. nocturnum*. The medium Knudson C modified statistically different from the others, the two light intensities, in the first test. In the second test, after seven months, with the alternative formulation means were not statistically different from each other. *In vitro* mycorrhization plantlets with isolated fungal En07 (*Waitea circinata*) showed greater visual effect compared to other treatments, but there was no statistical difference with control. The media with alternative formulation and Knudson C modified can be used *in vitro* development of *E. nocturnum*, and the isolated fungal En07 can be used in order mycorrhization of this orchid conservation strategies.

**Key words:** orchid, asymbiotic development, mycorrhization, fungus.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Lab. Genética de Microrganismos, Inst. Ciências Biológicas, Depto. Genética, Av. Esperança s.n., Campus Samambaia, 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Lab. Anatomia Vegetal, Inst. Ciências Biológicas, Depto. Botânica, Av. Esperança s.n., Campus Samambaia, 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Goiás, Lab. Cultura de Tecidos Vegetais, Inst. Ciências Biológicas, Depto. Genética, Av. Esperança s.n., Campus Samambaia, 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>4</sup> Autor para correspondência: bio.kcisbr@gmail.com

## Introdução

O cultivo *in vitro* de orquídeas é a melhor alternativa de propagação visto que, naturalmente, a porcentagem de germinação de sementes é baixa e a propagação vegetativa é lenta. As plântulas cultivadas em meios completamente assépticos apresentam sobrevivência baixa quando transferidas para seu habitat de ocorrência natural (Wu *et al.* 2011; Aewsakul *et al.* 2013). Na natureza, as orquídeas associam-se a fungos micorrízicos visando suprir a demanda por nutrientes tanto na germinação de sementes quanto no desenvolvimento inicial das plântulas (Rasmussen & Rasmussen 2009; Hossain *et al.* 2010). Durante a associação micorrízica o fungo coloniza células das raízes formando *pelotons* (hifas enoveladas) que são digeridos pela orquídea que, em contrapartida, fornece nutrição e proteção ao fungo (Rasmussen & Rasmussen 2009; Dearnaley *et al.* 2012). Os principais fungos micorrízicos obtidos de orquídeas no Brasil pertencem aos gêneros *Rhizoctonia* sp., *Epulorhiza* sp., e *Ceratorhiza* sp. (Nogueira *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2011; Gonçalves *et al.* 2014).

As orquídeas possuem limitações que dificultam a germinação de sementes como, por exemplo, a espessura da parede das células do tegumento envoltório do embrião e a quantidade de endosperma presente no embrião que, muitas vezes, é insuficiente para a germinação (Arditti & Ghani 2000). As plântulas de orquídeas podem ser obtidas, em laboratório, tanto por germinação assimbiótica *in vitro*, utilizando meios de cultivo assépticos (Hossain *et al.* 2010; Favetta *et al.* 2014), quanto germinação simbiótica com fungos micorrízicos (Zettlet *et al.* 2007) ou, ainda, micorrização de plântulas provenientes de germinação assimbiótica (Wu *et al.* 2011).

Os meios de cultivo utilizados na germinação e desenvolvimento de orquídeas são compostos por macro e micronutrientes, vitaminas e sais minerais (Murashige & Skoog 1962). Estes meios podem ser modificados, com a adição de polpa de frutas ou fertilizantes comerciais, visando melhor desenvolvimento e maior vigor de plântulas (Stewart & Kane 2006; Pascoal *et al.* 2009). O uso de polpa de frutas dificulta a reprodutibilidade dos resultados obtidos devido à variação nutricional, todavia há o barateamento do processo de obtenção de plântulas em larga escala e a facilitação técnica para produtores pouco especializados (Thompson *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2010; Favetta *et al.* 2014).

A orquídea *Epidendrum nocturnum* Jacq. pode ser rupícola ou epífita, com flores amarelo-esverdeadas e labelo em formato de ‘laço’. É uma planta que apresenta pequeno porte, o que pode facilitar o uso ornamental em vasos ou caules de plantas lenhosas e, ainda, possui aroma noturno agradável (“night scented orchid”). É relatada sua importância conservacionista na Flórida, EUA (Zettlet *et al.* 2007) e ocorre em alguns estados brasileiros, inclusive em campos rupestres de Cerrado da região Centro-Oeste (Zappi *et al.* 2015).

Há poucos relatos na literatura científica sobre orquídeas ocorrentes no Cerrado o que ressalta a importância de trabalhos que busquem esclarecer as associações micorrízicas e suas estratégias de conservação. Além disso, também é importante intensificar os estudos de micorrização de plântulas obtidas de germinação assimbiótica *in vitro* bem como o uso de meios de cultivo *in vitro* que sejam mais baratos e de fácil utilização (Wu *et al.* 2011; Aewsakul *et al.* 2013; Favetta *et al.* 2014). Nesse contexto, o presente estudo objetivou a visualização de fungos micorrízicos em raízes de *E. nocturnum* provenientes de área de Cerrado bem como desenvolvimento assimbiótico *in vitro* em diferentes meios de cultivo e a micorrização *in vitro* de plântulas.

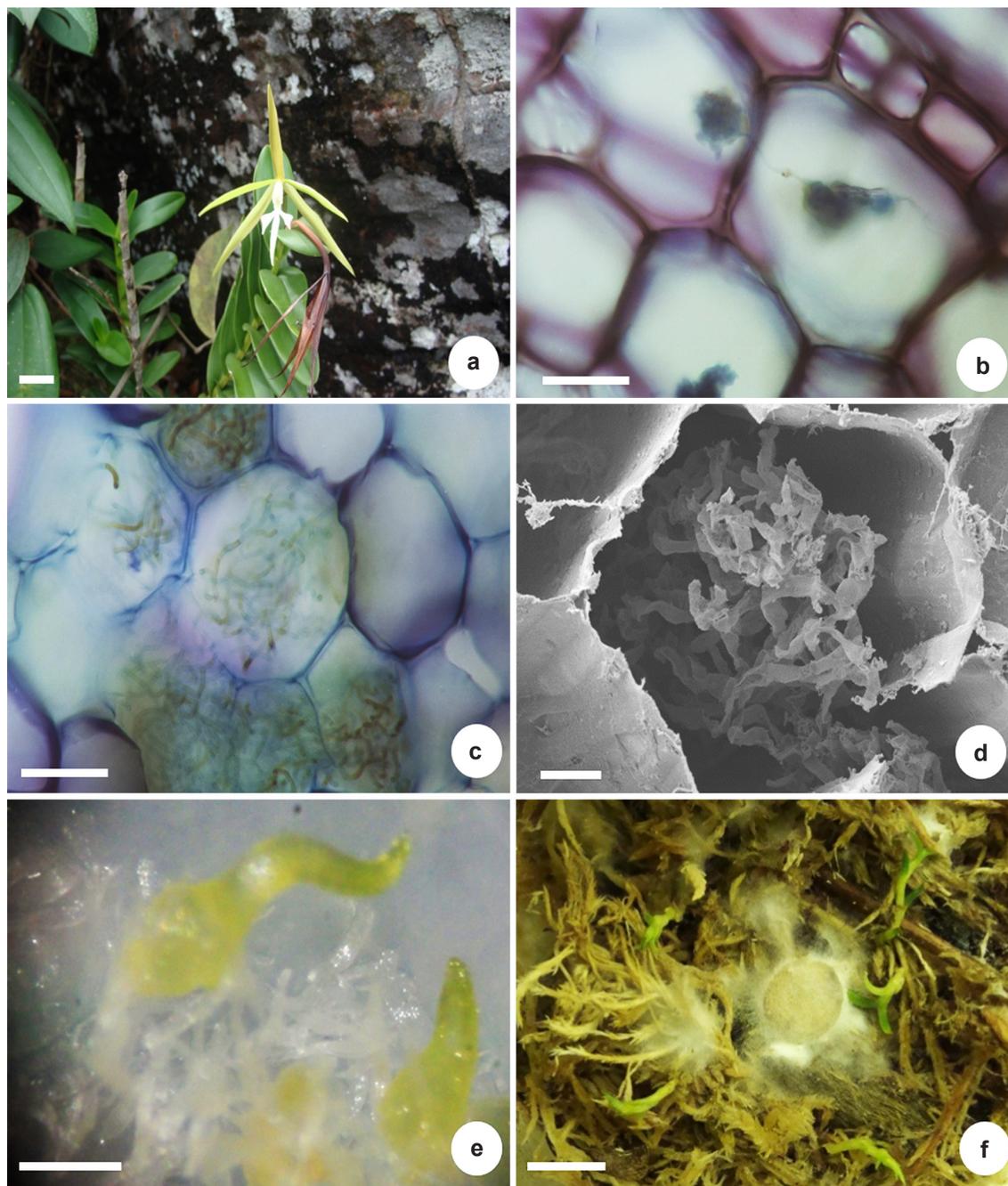
## Material e Métodos

### Condução dos ensaios e obtenção de material vegetal

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), de Anatomia Vegetal e de Genética de Microrganismos (LGM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB 4) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia - Goiás, Brasil. As raízes de *Epidendrum nocturnum* foram coletadas na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo - Serra Dourada (16°4'36,4"S, 50°11'16,9"W, 1006 m de altitude), Goiás - Brasil. As sementes utilizadas na germinação assimbiótica foram obtidas de cápsulas polinizadas manualmente, artificialmente, e abertas após cinco meses de maturação.

### Visualização de fungos nas raízes

Foram utilizadas amostras radiculares de três plantas de *E. nocturnum* (Fig. 1a) coletadas em ambiente natural. Nas observações em microscopia óptica (MO) o preparo dos cortes histológicos e a visualização dos fungos micorrízicos foram realizados de acordo com Gonçalves *et al.* (2014).



**Figura 1** – a. *Epidendrum nocturnum*, planta em área de Cerrado; b. hifa conectiva entre *pelotons* degradados de células vizinhas; c. *Pelotons* intactos nas células do córtex radicular de *E. nocturnum*; d. *Peloton* intacto visualizado em Microscopia eletrônica de Varredura (MEV); e. protocormos de *E. nocturnum* obtidos por germinação assimbiótica em meio Knudson C modificado; f. plântulas com o isolado fúngico En07 (*Waitea circinata*) sessenta dias após a micorrização. (Escala: a,f = 1 cm; b,c = 50  $\mu$ m; d = 10  $\mu$ m; e = 1 mm).

**Figure 1** – a. *Epidendrum nocturnum*, plant in the Cerrado area; b. hyphae connective between degraded pelotons of neighboring cells; c. intact pelotons in cells of the root cortex of *E. nocturnum*; d. intact peloton visualized on scanning electronic microscopy (SEM); e. protocorms of *E. nocturnum* obtained by asymbiotic germination in Knudson C modified medium; f. plantlets with isolated fungal En07 (*Waitea circinata*) sixty days after the *in vitro* mycorrhization. (Scales: a,f = 1 cm; b,c = 50  $\mu$ m; d = 10  $\mu$ m; e = 1 mm).

Para as observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram usados fragmentos radiculares com 1 cm de espessura, o preparo das amostras foi conforme Sena *et al.* (2013) e as visualizações realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), no Instituto de Física da UFG.

#### Germinação assimbiótica de sementes

Foram testados quatro meios: MS (Murashige & Skoog 1962); MS com metade de macronutrientes (MS ½); Knudson C modificado por Arditti (1977) e meio de cultura simplificado (água de coco verde, banana nanica no estágio 2 de maturação e adubo Foliar - Peter's® NPK 20-20-20). Todos os meios foram acrescidos com 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g/L<sup>-1</sup> de ágar (Material Suplementar). Os frascos foram mantidos a 24±2°C com 2760 lux de luminosidade (Ponert *et al.* 2011) e fotoperíodo de 16/8 h (Claro/Escuro) com lâmpada fluorescente tubular Sylvania® (F20 W T-12) branca 402, 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Pornpienpakdee *et al.* 2011). Foram avaliados os estádios de germinação de acordo com a escala de notas de 0 a 5 (Stewart & Kane 2006). Uma parte das plântulas obtidas neste ensaio de germinação foi utilizada no desenvolvimento das próximas etapas deste trabalho e a outra parte utilizada em demais pesquisas do LCTV.

#### Desenvolvimento *in vitro* de plântulas

Foram conduzidos ensaios de desenvolvimento *in vitro* com os meios Knudson C modificado por Arditti (1977), MS modificado (acrescido de hormônios) e MS (Suplemento 1). A unidade experimental foi um frasco de 150 mL contendo 30 mL de meio e seis plântulas com tamanho de 0,5±0,1 cm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e trinta repetições. Foram conduzidos dois experimentos simultâneos, com intensidades luminosas de 3720 e 1800 lux, que foram mantidos a 24±2°C e fotoperíodo de 16/8 h (Ponert *et al.* 2011; Pornpienpakdee *et al.* 2011). O número de folhas, altura da parte aérea (cm), o número de brotações e o tamanho da maior raiz (cm) foram avaliados após sessenta dias.

Foi conduzido um ensaio de desenvolvimento comparando o meio Knudson C modificado por Arditti (1977) com suas formulações alternativas: Knudson C acrescido de banana; Knudson C acrescido de abacaxi e Knudson C acrescido de banana, abacaxi e água de coco (Suplemento 1).

A unidade experimental foi um frasco de 150 mL contendo 30 mL de meio e seis plântulas com tamanho de 0,5±0,1 cm. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinquenta repetições. O experimento foi conduzido com intensidade luminosa de 3720 lux, temperatura de 24±2°C e fotoperíodo de 16/8 (Claro/Escuro). O número de folhas, altura da parte aérea (cm), o número de raízes, o tamanho da maior raiz (cm), o número de brotações e a porcentagem de sobrevivência de plântulas foram avaliados após sete meses. Os dados de porcentagem de sobrevivência foram transformados utilizando-se  $\arcsin \sqrt{x/100}$ . Todos os dados do crescimento *in vitro* foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando o *Software R* versão 2.11.0.

Na micorrização *in vitro* o delineamento foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 35 repetições. A unidade experimental foi um frasco de vidro (300 mL) preenchido com 100 g de substrato esfagno (*Sphagnum* sp.) previamente autoclavado e umedecido com 40 mL de água destilada. Foram utilizados fungos micorrízicos das orquídeas *E. nocturnum* (En), *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Cs), obtidos por Sousa (2012), e *Cyrtopodium vernum* Rchb. F. & Warm (Cv), obtidos por Gonçalves *et al.* (2014), que fazem parte da Coleção Permanente de Microrganismos do LGM.

Os tratamentos foram: Cs02 (*Epulorrhiza* sp.), Cs10 (*Epulorrhiza* sp.), Cs21 (*Epulorrhiza* sp.), En03 (*Epulorrhiza* sp.), En05 (*Epulorrhiza* sp.), En07 (*Waitea circinata - Rhizoctonia zeeae*), En24 (*Rhizoctonia* sp.), Cv17 (*Epulorrhiza* sp.) e controle (sem fungo). Cada frasco recebeu cinco plântulas (com três folhas e 0,5±0,1 cm de parte aérea) e um disco de 9 mm de diâmetro com o micélio fúngico. O número de folhas, altura da parte aérea (cm), o número de brotações e a porcentagem de sobrevivência de plântulas foram avaliados após sessenta dias. Os dados de porcentagem de sobrevivência foram transformados por  $\arcsin \sqrt{x/100}$  e submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando o *Software R* versão 2.11.0.

## Resultados

### Visualização de fungos nas raízes

As análises anatômicas permitiram a visualização de *pelotons* nas células parenquimáticas da região cortical das raízes de

**Tabela 1** – Influência do meio de cultivo sobre o número de folhas, altura da parte aérea (cm), número de brotações e tamanho da raiz (cm) em plântulas de *Epidendrum nocturnum* após sessenta dias de cultivo assimbiótico *in vitro*.  
**Table 1** – Effect of culture media on the number of leaves, shoot height (cm), number of shoots and root size (cm) in *Epidendrum nocturnum* plantlets after sixty days of *in vitro* asymbiotic cultivation.

Meio de cultivo	Nº de folhas		Altura (cm)		Nº de brotações		Maior raiz (cm)	
	3720 lux	1800 lux	3720 lux	1800 lux	3720 lux	1800 lux	3720 lux	1800 lux
Knudson C	3,76 a**	4,23 a	1,11 a	1,07 a	4,09 a	6,23 a	0,75 a	1,42 a
MS mod*	3,53 a	2,47 c	0,61 b	0,55 b	4,36 a	3,16 b	0,57 a	0,52 b
MS	3,76 a	3,37 b	0,58 b	0,70 b	3,83 a	3,36 b	0,78 a	1,55 a

\* Meio MS modificado (acrescido de 4 mg de auxina e 1 mg de citocinina).

\*\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, para cada parâmetro e para cada intensidade luminosa, na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

*E. nocturnum* (Fig. 1b-d). *Pelotons* degradados (Fig. 1b) e intactos (Fig. 1c,d) foram observados. Portanto, há associação natural entre plantas de *E. nocturnum* e fungos micorrízicos visto que as raízes foram coletadas em área de Cerrado. Também foi observada a presença de hifa conectiva entre *pelotons* degradados que ocorrem em células vizinhas (Fig. 1b) indicando que haja a colonização de uma nova célula como estratégia de manutenção da associação micorrízica.

#### Germinação assimbiótica de sementes

No ensaio de germinação assimbiótica *in vitro* foram obtidos protocormos de *E. nocturnum* (Estádio 3) quinze dias após a sementeira nos meios MS, MS ½ e Knudson C modificado (Fig. 1e). No meio com Formulação Simplificada observou-se intumescimento dos embriões e formação de rizoides (Estádio 2) somente trinta dias após a sementeira (dados não publicados).

Desenvolvimento in vitro de plântulas  
 Nos ensaios de desenvolvimento *in vitro*, para a intensidade luminosa de 3720 lux observou-se que o meio Knudson C modificado diferiu estatisticamente dos meios MS e MS ½ apenas na altura de plântulas (Tab. 1). Na intensidade de 1800 lux o Knudson C modificado diferiu dos demais para número de folhas, altura de plântulas e número de brotações (Tab. 1).

Foram testados outros meios e verificou-se após sete meses que os tratamentos não diferiram estatisticamente quanto a número de folhas, altura e número de brotações. Os meios com formulação alternativa ao Knudson C modificado (acrescidos com polpas de banana, abacaxi ou água de coco) proporcionaram maior número e tamanho de raízes. O meio acrescido de banana proporcionou maior porcentagem de sobrevivência, mas não diferiu do Knudson C acrescido de abacaxi (Tab. 2).

**Tabela 2** – Efeito de diferentes meios de cultivo nas características número de folhas, altura da parte aérea (cm), número de raiz, tamanho da raiz (cm), número de brotações e sobrevivência (%) de plântulas de *Epidendrum nocturnum*.  
**Table 2** – Effect of different culture media on the number of features leaves, shoot height (cm), root number, root size (cm), number of shoots and survival (%) of *Epidendrum nocturnum* plantlets.

Tratamento	Nº folhas	Altura (cm)	Nº raízes	Tamanho da raiz (cm)	Nº brotações	Sobrevivência (%)
Knudson C modificado por Arditti (1977)	3,0 a*	0,46 a	1,14 b	0,02 b	1,82 a	86 b
Knudson C acrescido de banana	3,76 a	0,45 a	3,7 a	0,41 ab	3,3 a	92 a
Knudson C acrescido de abacaxi	3,26 a	0,39 a	4,28 a	0,65 a	2,46 a	88 ab
Knudson C acrescido de água de coco, banana e abacaxi	2,92 a	0,52 a	4,04 a	0,58 a	2,34 a	82 b

\* Médias seguidas pelas mesmas letras, para cada variável na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Na micorrização *in vitro* observou-se que o isolado En07 (*W. circinata*) não diferiu estatisticamente do controle (Tab. 3). Contudo, com o isolado En07 as plântulas apresentaram aspecto visual mais vigoroso do que com os

demais fungos. Além disso, as plântulas não foram sobrepostas pelas hifas do En07 o que facilita a observação do desenvolvimento (Fig. 1f) bem como o manuseio das plântulas em uma posterior aclimatização.

**Tabela 3** – Número de folhas, altura da parte aérea (cm), número de raiz, número de brotações e sobrevivência (%) de plântulas de *Epidendrum nocturnum* sessenta dias após a micorrização *in vitro*.

**Table 3** – Number of leaves, shoot height (cm), root number, number of shoots and survival (%) of *Epidendrum nocturnum* plantlets sixty days after the *in vitro* mycorrhization.

Tratamento	Gênero	Nº de folhas	Altura (cm)	Nº de brotações	Sobrevivência (%)
Cs02	<i>Epulorhiza</i> sp.	0,73 d	0,18 cd	0,06 a	17 d
Cs10	<i>Epulorhiza</i> sp.	0,8 cd	0,12 d	0,13 a	80 b
Cs21	<i>Epulorhiza</i> sp.	0,4 d	0,07 d	0 a	14 d
En03	<i>Epulorhiza</i> sp.	3,73 a	0,49 ab	0,20 a	100 a
En05	<i>Epulorhiza</i> sp.	2,27 a	0,43 abc	0,26 a	80 b
En07	<i>W. circinata</i>	3,26 a	0,52 a	0,26 a	100 a
En24	<i>Rhizoctonia</i> sp.	1,0 bcd	0,22 bcd	0,13 a	27 c
Cv17	<i>Epulorhiza</i> sp.	2,33 ab	0,47 abc	0,26 a	74 b
-	Controle	2,26 abc	0,61 a	0,26 a	100 a

## Discussão

*Epidendrum nocturnum* possui *pelotons* em suas raízes e, portanto, apresenta associação micorrízica como visto também para as espécies *Epidendrum dendrobioides* Thumb. (Nogueira *et al.* 2005) e *Epidendrum secundum* Jacq. (Pereira *et al.* 2011). Fungos Micorrízicos de Orquídeas (FMOs) pertencem ao gênero *Rhizoctonia* sp. (*Epulorhiza* sp., e *Ceratorhiza* sp., dentre outras sinonímias) e fornecem benefícios às plantas tanto na germinação de sementes bem como na fase adulta (Rasmussen & Rasmussen 2009; Dearnaley *et al.* 2012).

No presente estudo testou-se o desenvolvimento *in vitro* de *E. nocturnum* nos meios MS, MS acrescido de hormônios, Knudson C modificado por Arditti (1977) e também foram testados meios com formulação alternativa, com adição de polpa de frutas ao meio Knudson C modificado. Notou-se que o meio Knudson C modificado por Arditti (1977) e suas formulações alternativas são eficientes no desenvolvimento das plântulas da orquídea.

Favetta *et al.* (2014) verificaram que plantas da orquídea *Vanda tricolor* Lindl. podem ser

cultivadas tanto em meio MS quanto em meios alternativos, como o simplificado à base de fertilizante Biofert® e o MS acrescido de polpa de banana. Pascoal *et al.* (2009) constataram que o uso de polpa de banana nanica melhorou o desempenho do meio Knudson C na multiplicação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl., orquídea de apelo ornamental. Ferreira *et al.* (2010) testaram a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro, orquídea epífita, e notaram que o meio à base de banana nanica foi mais eficiente do que o meio MS para esta espécie. Embora dificultem a reprodutibilidade dos resultados os meios com acréscimo de polpa de frutas barateiam os custos de produção de plântulas e tornam mais fácil o processo de obtenção e cultivo destas plântulas.

No presente estudo, o isolado En07 (*W. circinata*) promoveu plântulas mais vigorosas embora não tenha diferido estatisticamente do controle (sem fungo). As hifas do isolado En07 não sobrepueram plântulas de *E. nocturnum* o que facilita a visualização e manuseio destas plântulas. Sousa (2012) verificou germinação simbiótica *in vitro* de sementes de *C. saintlegerianum* com o

**Suplemento 1** – Componentes e quantidades de nutrientes usados nos meios de cultivo testados nos ensaios com sementes e plântulas de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Valores sem unidades estão em gL<sup>-1</sup>).

Componentes	MS	MS ½	MS modificado	Knudson C	Knudson C modificado por Arditi 1977	Knudson C acrescido de banana	Knudson C acrescido de abacaxi	Knudson C acrescido de banana, abacaxi e água de coco	Meio simplificado
Abacaxi							100	33,3	
Ácido Bórico	0,62	0,62	0,62						
Acido Nicotínico	0,1	0,1	0,1						
Açúcar Comercial									30
Adubo foliar									2
Agar	7	7	7	7	7	7	7	7	7,5
Água de coco					100 mL			33,3 mL	100 mL
Auxina			4 mg						
Banana nanica						100		33,3	100
Citocínica			1 mg						
Cloreto de cálcio	44	22	44						
Cloreto de cálcio Hexa-hidratado	0,0025	0,0025	0,0025						
Fosfato biácido de potássio				0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Fosfato de potássio	17	8,5	17						
Glicina	0,4	0,4	0,4						
Iodeto de potássio	0,083	0,083	0,083						
Mio-inositol	0,1	0,1	0,1						
Molibdato de Sódio Dihidratado P.A.	0,025	0,025	0,025						
Na4EDTA.2H2O	3,73	3,73	3,73						
Nitrato de amônio	165	82,5	165						
Nitrato de cálcio				1	1	1	1	1	
Nitrato de potássio	190	95	190						
Piridoxina.HCl	0,1	0,1	0,1						
Sacarose	30	30	30	20	20	20	20	20	
Sulfato de amônio				0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Sulfato de cobre penta-hidratado	0,0025	0,0025	0,0025						
Sulfato de ferro				25 mg	25 mg	25 mg	25 mg	25 mg	
Sulfato de magnésio	37	18,5	37	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
Sulfato de manganês				7,5 mg	7,5 mg	7,5 mg	7,5 mg	7,5 mg	
Sulfato de Manganês PA.ACS Monohidratado	1,69	1,69	1,69						
Sulfato de zinco	0,86	0,86	0,86						
Sulfato ferroso hepta-hidratado	2,78	2,78	2,78						
Tiamina.HCl	0,02	0,02	0,02						

isolado En07 foi de 81% e diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos testados. Zettler *et al.* (2007) fizeram a reintrodução de plantas de *E. nocturnum* germinadas simbioticamente com fungo proveniente da orquídea *Spiranthes brevilabris* Lindl. Contudo, o presente estudo apresenta a utilização de fungo específico na micorrização de *E. nocturnum*, simulando o que acontece em ambiente natural. Aewsakul *et al.* (2013) testaram a germinação de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *Spathoglottis plicata* Blume em diferentes substratos usando isolados micorrízicos (*Epulorhiza* sp.) e constataram maior eficiência dos fungos quando comparados com o controle.

Na germinação e no desenvolvimento asséptico de orquídeas o carbono e os demais nutrientes são fornecidos nos meios de cultivo (Hossain *et al.* 2010). Na natureza, as sementes de orquídeas associam-se aos fungos micorrízicos para suprir a demanda por nutrientes durante a germinação (Dearnaley *et al.* 2012). A germinação simbiótica proporciona a obtenção de plântulas robustas para a reintrodução no ambiente natural (Zettler *et al.* 2007). A micorrização de plântulas proporciona maior absorção de nutrientes e proteção a estresses bióticos e abióticos nas etapas de aclimatização ou reintrodução no ambiente natural (Wu *et al.* 2011; Dearnaley *et al.* 2012; Aewsakul *et al.* 2013).

Assim, os resultados obtidos sugerem que plantas de *E. nocturnum* possuem associação natural com fungos micorrízicos. Os meios Knudson C modificado por Arditti (1977) e com formulação alternativa, com adição de polpa de frutas, são eficientes no desenvolvimento de plântulas de *E. nocturnum*. Os isolados micorrízicos podem ser usados na micorrização desta orquídea proporcionando maior vigor visual às plântulas aumentando as chances de sobrevivência tanto para comercialização quanto para reintrodução.

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Goiás (FAPEG), o apoio financeiro. Também agradecemos ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), no Instituto de Física (UFG), Goiânia - GO, a parceria neste estudo.

### Referências

Aewsakul, N.; Maneesorn, D.; Serivichyaswat, P.; Taluengjit, A. & Nontachaiyapoom, S. 2013.

- Ex vitro* symbiotic germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae* 160: 238-242.
- Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: a manual. *In: Arditti, J. Orchid Biology review and perspectives*. Vol. 1. Cornell University Press, Ithaca, New York. Pp. 203-293.
- Arditti, J. & Ghani, A.K.A. 2000. Tansley review n°. 110 Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367-421.
- Dearnaley, J.D.W.; Martos, F. & Selosse, M.A. 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. *In: Hock, B. (ed.). The Mycota IX: fungal associations*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer, Berlin. Pp. 207-230.
- Favetta, V.; Colombo, R.C. & Faria, R.T. 2014. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. *Revista de Ciências Agrárias* 57: 114-117.
- Ferreira, A.W.C.; Lima, A.I.S.; Faria, R.T.; Ribeiro, J.P.N. & Casali, C.A. 2010. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica* 24: 636-639.
- Gonçalves, F.J.; Nunes, C.M.C.; Filippi, M.C.; Araújo, L.G.; Gonçalves, L.A. & Sibov, S.T. 2014. Isolation and characterization of mycorrhizal fungi of *Cyrtopodium venum* Rchb. F. & Warm (Orchidaceae). *Revista de Ciências Agrárias* 57: 244-249.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C.S. & Mendonça, M. 2005. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do quadrilátero ferrífero, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 3: 417-424.
- Pascoal, M.; Figueiredo, M.A.; Rezende, J.C.; Araújo, A.G.; Santos, F.C.; Ferreira, E.A. & Junqueira, K.P. 2009. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. *Horticultura Brasileira* 27: 211-216.
- Pereira, M.C.; Torres, D.P.; Guimarães, F.A.R.; Pereira, O.L. & Kasuya, M.C.M. 2011. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Botanica Brasilica* 25: 534-541.
- Ponert, J.; Vosolsobě, S.; Kmečová, K. & Lipavská, H. 2011. European orchid cultivation - from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1: 95-107.
- Pornpienpakdee, P.; Singhasurasak, R.; Chaiyasap, P.; Pichyangkura, R.; Bunjongrat, R.; Chadchawan, S. & Limpanavech, P. 2011. Improving

- the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Scientia Horticulturae* 124: 490-499.
- Rasmussen, H.N. & Rasmussen, F.N. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334-345.
- Sena, A.P.A.; Chaibub, A.A.; Côrtes, M.V.C.B.; Silva, G.B.; Silva-Lobo, V.; Prabhu, A.S.; Filippi, M.C.C. & Araújo, L.G. 2013. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. *Tropical Plant Pathology* 38: 387-397.
- Sousa, K.C.I. 2012. Caracterização morfológica de fungos para a germinação *in vitro* de sementes de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. e *Epidendrum nocturnum* Jacq. (ORCHIDACEAE), ocorrentes no Cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 129p.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E. 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 159-167.
- Thompson, D.I.; Edwards, T.J. & van Standen, J. 2006. Evaluation aymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation* 49: 269-284.
- Wu, P.; Huang, D. & Chang, C.N. 2011. Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. *African Journal of Biotechnology* 10: 10095-10100.
- Zappi, D.C.; Ranzato Filardi, F.L.; Leitman, P.; Souza, V.C.; Walter, B.M.T.; Pirani, J.R.; Morim, M.P.; Queiroz, L.P.; Cavalcanti, T.B.; Mansano, V.F. & Forzza, R.C. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113.
- Zettler, L.W.; Poulter, S.B.; Mcdonald, K.I. & Stewart, S.L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience* 42: 135-139.