



**CAMILA DE MARILLAC COSTA NUNES**

**FENOLOGIA, BIOLOGIA FLORAL E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE  
*Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. (ORCHIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Agronomia.  
Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

**Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov**

GOIÂNIA, GO - Brasil

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

**Nunes, Camila de Marillac Costa.**

**N972f** Fenologia, biologia floral e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. (Orchidaceae)[manuscrito] / Camila de Marillac Costa Nunes. – 2009.  
xv,102 f. : il.,color., figs., tabs.

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2009.**

Bibliografia.

**Inclui lista de tabelas, figuras, símbolos e siglas.**

**Anexos.**

**1. Orquídeas – Cultivo – Cerrado 2.Fenologia 3. Propagação *in vitro* 4.Biologia floral. I. Sibov, Sérgio Tadeu II. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos.  
III. Título.**

CDU: 582.594.2(251.3)

**DEDICO** este trabalho à Deus pela orientação no entendimento de sua fabulosa Criação.

**OFEREÇO** este trabalho aos meus pais, Luiza e Arivaldo, pela confiança e sabedoria de sempre me guiarem e me ampararem nesta jornada. Aos meus irmãos Amanda e Rogério, pela fraternidade, carinho e apoio. Ao meu noivo Gustavo, por todo amor, incentivo e paciência incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, nas pessoas da Coordenadora Professora Doutora Mara Rúbia da Rocha e do Secretário Welinton Barbosa Mota e demais funcionários, por todo auxílio oferecido.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico – CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás – FAPEG, pela concessão de recursos para realização dos experimentos.

Ao Instituto de Ciências Biológicas/ UFG, ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, ao Laboratório de Anatomia Vegetal, pela utilização de equipamentos e instalações.

Aos funcionários de todos os Setores e Unidades da UFG, pelo auxílio prestado.

À SIMEGO/SECTEC, na pessoa da Doutora Rosidalva Lopes, bem como aos seus funcionários, pela concessão dos dados meteorológicos.

Ao Professor Doutor José Ângelo Rizzo, por todas as orientações e autorizações para realização dos estudos na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo.

Aos guardas da Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, por todo auxílio e generosidade.

Ao Professor Doutor Sérgio Tadeu Sibov, pela orientação, auxílio e amizade.

Às professoras do Laboratório de Anatomia Vegetal Doutora Maria Helena, Doutora Letícia e Mestre Maria Tereza, pelo auxílio, sugestões, generosidade e amizade.

À professora Doutora Marta Cristina Fillipi, pelo auxílio e orientação.

Ao Vinícius, pela elaboração cuidadosa e detalhada do desenho de *Cyrtopodium eugenii*.

À Daniela Mota, por todo auxílio, amizade e generosidade.

Ao Fábio, por toda amizade, auxílio, apoio e incentivo.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais /UFG, Luiz Valério, Gabriel, Rodrigo, Lucas, Richard, pelo apoio, auxílio e contribuição para realização deste trabalho.

À Aracelle Assunção, pela gentileza, amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Aos demais amigos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG  
Fábio, Adélia, Keyla, Luis Cláudio, Pedro Moçambique e Welinton.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS .....	12
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>2</b> <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1</b> <b>FAMÍLIA ORCHIDACEAE</b> .....	19
<b>2.1.1</b> <b>Fenologia e biologia floral de Orchidaceae</b> .....	22
<b>2.1.2</b> <b>Mercado mundial de orquídeas</b> .....	24
<b>2.2</b> <b>ORQUÍDEAS NO CERRADO</b> .....	25
<b>2.3</b> <b>O GÊNERO <i>Cyrtopodium</i> R. Br.</b> .....	26
<b>2.4</b> <b>A ESPÉCIE <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. &amp; Warm.</b> .....	28
<b>2.5</b> <b>PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS</b> .....	31
<b>2.5.1</b> <b>A cultura de tecidos vegetais</b> .....	31
<b>2.5.2</b> <b>Germinação assimbiótica <i>in vitro</i></b> .....	36
<b>2.5.3</b> <b>Germinação simbiótica <i>in vitro</i></b> .....	37
<b>2.6</b> <b>CONSERVAÇÃO E MELHORAMENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES DO CERRADO</b> .....	40
<b>3</b> <b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>4</b> <b>FENOLOGIA E BIOLOGIA FLORAL DE <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. &amp; Warm. (ORCHIDACEAE: Cyrtopodiinae)</b>	
RESUMO .....	54
ABSTRACT .....	55
<b>4.1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>4.2</b> <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
<b>4.2.1</b> <b>Fenologia</b> .....	58
<b>4.2.2</b> <b>Morfologia e biologia floral</b> .....	59
<b>4.2.2.1</b> <b>Morfologia floral</b> .....	59

4.2.2.2	Verificação da produção de odor .....	59
4.2.2.3	Receptividade do estigma .....	59
4.2.2.4	Antese e fenescência .....	60
4.2.2.5	Caracterização histoquímica e determinação da concentração de sólidos solúveis presentes na substância excretada nas partes reprodutivas de <i>C. eugenii</i> .....	60
4.2.2.6	Verificação da presença de nectários extra-florais .....	61
<b>4.2.3</b>	<b>Visitantes florais</b> .....	61
<b>4.2.4</b>	<b>Sistema reprodutivo</b> .....	61
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
4.4	CONCLUSÕES .....	76
4.5	REFERÊNCIAS .....	76
<b>5</b>	<b>GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. &amp; Warm. (ORCHIDACEAE: Cyrtopodiinae)</b>	
	RESUMO .....	82
	ABSTRACT .....	83
5.1	INTRODUÇÃO .....	83
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	85
<b>5.2.1</b>	<b>Cultivo assimbiótico</b> .....	86
<b>5.2.2</b>	<b>Cultivo simbiótico</b> .....	87
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
<b>5.3.1</b>	<b>Cultivo assimbiótico</b> .....	88
<b>5.3.2</b>	<b>Cultivo simbiótico</b> .....	92
5.4	CONCLUSÕES .....	95
5.5	REFERÊNCIAS .....	95
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	98
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b> .....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b>	Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) para as características fenológicas de <i>C. eugenii</i> em n=51 indivíduos .....	65
<b>Tabela 4.2.</b>	Número total de flores utilizadas para cada tratamento em sete plantas de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. presentes no campo e a proporção de frutos formados em cada tratamento, respectivamente.....	74
<b>Tabela 5.1.</b>	Estádio de desenvolvimento de sementes de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. cultivadas <i>in vitro</i> , de acordo com o número de protocormos obtidos, durante 13 semanas .....	87
<b>Tabela 5.2.</b>	Notas atribuídas aos estádios de desenvolvimento de sementes de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. cultivadas simbioticamente <i>in vitro</i> , durante 120 dias .....	88
<b>Tabela 5.3.</b>	Porcentagem de sementes nos seus diferentes estádios de desenvolvimento e porcentagem total de germinação de sementes de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. cultivadas simbioticamente <i>in vitro</i> .....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b>	Folhas (a) e pseudobulbos (b) de plantas de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. ....	28
<b>Figura 2.2.</b>	Planta de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. Terrestre, cujas flores estão dispostas em inflorescências longas (a); Flor (b) e Fruto (c) .....	30
<b>Figura 2.3.</b>	Corte transversal da raiz de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. Em que a seta indica a presença de pelotons intactos no interior da célula (400x) (Gonçalves, 2009) .....	38
<b>Figura 4.1.</b>	Município de Mossâmedes, no estado de Goiás, onde está localizada a Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, local de estudo de três sub-populações de plantas de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. ....	57
<b>Figura 4.2.</b>	Porção inferior da planta de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. Mostrando as raízes fasciculadas e a inserção das folhas na base dos pseudobulbos (a) e o hábito saxícola, também observado para esta espécie .....	62
<b>Figura 4.3.</b>	<i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. a. Pseudobulbos, b. Inflorescência, c. Perianto dissecado, d. Antera, e. Coluna em vista lateral, mostrando detalhes da antera, f. Fruto, g. Folhas .....	63
<b>Figura 4.4.</b>	Aspectos climáticos e do comportamento de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. em três sub-populações naturais, <span style="color: blue;">→</span> Sub-população A <span style="color: magenta;">→</span> Sub-população B <span style="color: black;">→</span> Sub-população C , durante um ano de avaliação. a. Médias térmicas mensais; b. Médias das precipitações pluviais; c. Número médio de pseudobulbos por sub-população; d. Número médio de brotos de pseudobulbos por sub-população; e. Número médio de folhas por sub-população; f. Altura média das hastes florais por sub-população; g. Número médio de flores por sub-população; h. Número médio de frutos por sub-população .....	67
<b>Figura 4.5.</b>	As setas indicam a secreção de uma substância incolor liberada na haste floral, pedicelos (a) e nas flores (b) de plantas de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. durante a floração .....	70

<b>Figura 4.6.</b>	Corte longitudinal da haste floral de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. em que as setas indicam presença de canais secretores de mucilagem, os quais apresentam forma alongada bastante característica .....	71
<b>Figura 4.7.</b>	Corte transversal da haste floral de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. em que as setas indicam as pontuações coradas, reveladas através do cloreto de ferro III, as quais são produtos de condensação das proteínas mucilaginosas, revelado através do teste de Pizzolato & Lillie (1973) .....	71
<b>Figura 5.1.</b>	Placa de petri contendo meio AA (a) sobre o qual foi colocado o papel filtro (b) com as sementes de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. (c) e a 6 cm, o bloco de meio FA (d) contendo o isolado micorrízico .....	88
<b>Figura 5.2.</b>	(a) Sementes de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. no meio KC, sete dias após a semeadura <i>in vitro</i> , apresentando coloração escura; (b) Protocormos iniciais de <i>C. eugenii</i> aclorofilados no meio ½ MS, 21 dias após a semeadura <i>in vitro</i> .....	89
<b>Figura 5.3.</b>	Número médio de protocormos de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. obtidos nos meios  MS  1/2 MS  KC, durante os 91 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	90
<b>Figura 5.4.</b>	Protocormos de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm., aos 85 dias de cultivo <i>in vitro</i> assimbiótico nos meios MS completo (a), KC (b) e ½ MS (c) .....	91
<b>Figura 5.5.</b>	(a) Semente de <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f. & Warm. apresentando embrião intumescido (100x). (b) Embrião rompendo o tegumento 120 dias após estabelecimento do cultivo simbiótico <i>in vitro</i> (200x) .....	93

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

% - Porcentagem

± - Variando entre

° ‘ “ – Coordenadas geográficas em graus, minutos e segundos, respectivamente

μL – Microlitro

μEistein m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> – MicroEistein por metro quadrado por segundo

°C – Graus Celsius

°Brix – Graus Brix

½ MS – Meio Murashige & Skoog (1962) com redução à metade da concentração dos macronutrientes

AA – Ágar-Aveia

ABA – Ácido abscísico

AIB – Ácido Indol-Butírico

Alt. – Altura

BAP – 6-Benzilaminopurina

BDA – Batata- Dextrose- Ágar

cm – Centímetros

cm<sup>2</sup> – Centímetros quadrados

cm / dia – Centímetros por dia

CV – Coeficiente de variação

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FA – Fubá-Ágar

FAA<sub>50</sub> – Formaldeído, ácido acético glacial e etanol a 50 %

FeEDTA - ferro-ácido etileno-diamino tetraacético

FV – Fonte de variação

g - Grama

GA<sub>3</sub> – Ácido giberélico

GL – Graus de liberdade

GO – Goiás

h – Horas

ha - hectares

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Água oxigenada

KB – Meio de Knudson B

KC – Meio de Knudson C

KIN - Cinetina

Km – Kilômetros

LCTV – ICB 4 – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas 4

m – Metros

m<sup>2</sup> – Metros quadrados

min. – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MS – Meio Murashige & Skoog (1962)

n – número

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NP – Número médio de pseudobulbos

NB – Número médio de brotos de pseudobulbos

NF – Número médio de folhas

NFl – Número médio de flores

NFr – Número médio de frutos

p – p valor

pH – Potencial hidrogeniônico

PVC – Policloreto de Vinila

r – Coeficiente de correlação linear de Pearson

Rchb. f. & Warm. – Reichenbach & Warming

SECTEC - Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia do Governo de Goiás

SIMEGO - Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos do Estado de Goiás

t – teste t

v/v – Volume por volum

## RESUMO

NUNES, C. M. C. **Fenologia, biologia floral e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. (Orchidaceae).** 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.<sup>1</sup>

A espécie *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. (Orchidaceae) é amplamente distribuída pelo Brasil, sendo o Planalto Central o seu principal centro de diversidade. *C. eugenii* é uma espécie terrestre, comumente encontrada no Cerrado, crescendo em solos arenosos, ambientes secos e à meia sombra. Devido ao caráter exótico de sua inflorescência e à beleza de suas flores, *C. eugenii* apresenta elevado potencial ornamental e comercial. Entretanto, não são encontrados estudos para sua preservação ou métodos para obtenção de mudas que possam ser utilizadas na floricultura ou no paisagismo. Assim, o presente estudo tem como objetivos caracterizar a fenologia, a morfologia e os aspectos reprodutivos desta espécie de orquídea e estabelecer protocolos para germinação simbiótica e assimbiótica *in vitro*. Parte do trabalho foi desenvolvida na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, um remanescente florestal de 500 ha do bioma Cerrado, cuja vegetação predominante é do tipo Cerrado Rupestre, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes – GO. No período de julho de 2007 a agosto de 2008 foram realizadas visitas mensais para acompanhamento e coleta de dados fenológicos e de biologia floral de 51 indivíduos, distribuídos em três sub-populações. Para o estabelecimento dos protocolos de germinação *in vitro* de *C. eugenii* estabeleceu-se o cultivo simbiótico, pareando o isolado fúngico contendo o micélio micorrízico de *Epulorhiza* sp., obtido a partir de raízes de *C. eugenii*, com as sementes de *C. eugenii* em meio FA, e o cultivo assimbiótico, em que as sementes foram cultivadas em meios de cultura comumente usados para germinação de orquídeas, sendo o meio MS completo, o meio MS com redução à metade da concentração de macronutrientes (½ MS) e o meio de Knudson (KC). A análise do comportamento de *C. eugenii* permitiu verificar que esta espécie apresenta floração anual e na época seca. Na época chuvosa, quando a temperatura é mais elevada, plantas de *C. eugenii* passam a investir sua energia na produção de partes vegetativas, tais como brotos de pseudobulbos e folhas. As flores de *C. eugenii* são dispostas de forma cíclica nas hastes florais, as quais chegam a atingir até 130 cm de altura. Esta espécie é autocompatível, embora em condições naturais, a taxa de frutificação seja baixa. Não foi observada presença de polinizadores eficientes. Foi verificada elevada frequência de formigas durante a floração. Porém, as observações indicaram que estes insetos atuam apenas como pilhadores e que são atraídos pela secreção de uma substância liberada constantemente na época da floração ao longo da haste floral e cujo teor de sólidos solúveis é elevado. O estabelecimento da germinação simbiótica *in vitro* não revelou resultados satisfatórios uma vez que a formação de protocormos não foi obtida. Todavia, resultados satisfatórios foram encontrados na germinação assimbiótica *in vitro*, sendo o meio ½ MS superior ao KC e ao MS completo para o tempo, taxa de germinação de sementes e estabelecimento de novas plântulas de *C. eugenii*.

*Palavras-chave:* orquídeas, Cerrado, cultura de tecidos.

---

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

## ABSTRACT

NUNES, C. M. C. **Fenology, floral biology e *in vitro* germination of *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. (Orchidaceae).** 2009. 102 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.<sup>1</sup>

*Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. (Orchidaceae) is a specie widely distributed in Brazilian savannah, being the Planalto Central its main center of diversification. *C. eugenii* is a terrestrial specie, usually found in the Cerrado, growing in sand soil, dry environment and to the half shade. Due the beauty and exotic character of its flowers, *C. eugenii* present high ornamental and commercial potential. However, no studies were found of its preservation even *in vitro* protocols for shoots obtainment to be used in flower production. Thus, the present study has as objective to characterize the fenology, morphology and reproductive biology in *C. eugenii* and to establish protocols for symbiotic and asymbiotic germination *in vitro*. The plants studied grows at the Biological Reserve Prof. Jose Ângelo Rizzo, a forest remainder of 500 ha of bioma Cerrado, whose predominant vegetation is of the type Cerrado Rupestre, located in the Serra Dourada, city of Mossamedes-GO. From the months of July of 2007 through August of 2008 monthly visits had been carried out for accompaniment and collects of data of 51 plants, distributed in three populations. For the establishment of the germination protocols *in vitro* of *C. eugenii* established the symbiotic culture, pairs the isolated fungic contends the mycorrhizae *Epulorhiza* sp., obtained from roots of *C. eugenii*, with the seeds of *C. eugenii* in medium FA, and the asimbytic culture, where the seeds had been cultivated in culture mediuns that are regularly used for seed orchids germination, being the complete MS medium, the MS medium with reduction to the half of the concentration of macronutrients (½ MS) and the Knudson medium (KC). The analysis of the behavior of *C. eugenii* allowed to verify that this species present annual budding and at the dry time. At the rainy time, when the temperature raised, plants of *C. eugenii* start to invest its energy in the production of vegetative parts, such as sprouts of pseudobulbs and leves. The flowers of *C. eugenii* are disposed of cyclical form in the floral connecting rods, which arrive to reach up to 130 cm of height. This species is self-compatible, even so in natural conditions, the fruit set is low. Not evidenced was presence of efficient pollinators. High frequency of ants during budding of *C. eugenii* was verified. However, the observations indicated that these insects only act as visitors and they are attracted by the secretion of substance at the time of the budding throughout the floral connecting rod and that have high concentration of soluble solid. The establishment of the symbiotic germination *in vitro* did not disclose resulted satisfactory because no protocorms formation were obtained. However, satisfactory results had been founded in the asymbiotic germination *in vitro*, being the ½ MS medium superior to the KC and the complete MS medium for the time, germination of seeds and establishment of new plants of *C. eugenii*.

*Key words:* orchids, Cerrado, tissue culture.

---

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.