

Germinação de orquídeas *in vitro*

In vitro orchid germination

RESUMO

Dianaafaz Eloiza Canan
dianaafaz_eloiza@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil

Betty Cristiane Kuhn
bettykuhn@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil

Orquídeas apresentam dificuldade de germinação pois são desprovidas de tecido de reserva, sendo necessária simbiose com fungos micorrízicos e espécie-específicos sendo rara sua germinação na natureza. O objetivo desse trabalho foi realizar a germinação de sementes de orquídeas *in vitro* sem interação com micorrizas. Foram utilizadas sementes de quatro espécies (*Catleya violacea*; *Epidendrum radicans*; *Dendrobium nobile*. Após a assepsia, as sementes, foram inoculadas em frascos de vidro com meio de cultura, nos seguintes tratamentos: MS, Knudson puro; Knudson com adição de vitaminas e micronutrientes do MS; Knudson mais suco de cenoura. O delineamento foi inteiramente casualizado, bifatorial(4x4), foi avaliado o tamanho das plântulas e efetuado a análise estatística. As sementes das espécies do gênero *Catleya* e *Epidendrum* não germinaram, já a *Dendrobium* apresentou bom desenvolvimento e germinação no meio de cultura MS seguido por Knudson mais cenoura e menor desenvolvimento foi em meio de cultura Knudson puro, fato que ocorre devido a composição do meio MS ser mais completa. Para estudos científicos indica-se o uso do meio MS ou Knudson com vitaminas e micronutrientes, já para fins de comercialização indica-se o uso de Knudson acrescido de cenoura.

PALAVRAS-CHAVE: Sementes. Semeadura. Meio de Cultura. Desenvolvimento.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Orchids are difficult to germinate because they are devoid of reserve tissue, and symbiosis with mycorrhizal and species-specific fungi is required and their germination is rare in nature. The objective of this work was to perform in vitro orchid seed germination without interaction with mycorrhizae. Seeds of four species (*Catleya violacea*; *Epidendrum radicans*; *Dendrobium nobile*) were used. After asepsis, the seeds were inoculated into glass flasks with culture medium in the following treatments: MS, pure Knudson; Knudson with added vitamins and micronutrients. Knudson plus carrot juice The design was completely randomized, bifactorial (4x4), seedling size was evaluated and statistical analysis was carried out. The seeds of the genus *Catleya* and *Epidendrum* did not germinate, whereas *Dendrobium* showed good development. and germination in the MS culture medium followed by Knudson more carrot and less development was in pure Knudson culture medium, which is due to the more complete MS medium composition. For scientific studies the use of MS or Knudson medium with vitamins and micronutrients, for commercial purposes it is indicated the use of Knudson plus carrot.

KEYWORDS: Seeds. Seeding. Culture medium. Development.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são angiospermas, epífitas, pertencente à família *Orchidaceae* que conta com cerca de 35.000 espécies e cerca de 850 gêneros (SOUZA e LORENZI, 2005). Apenas no Brasil são encontradas cerca de 200 gêneros, sendo que de acordo com o Livro Vermelho da Flora Brasileira 169 espécies de orquídeas estão ameaçadas, 30 espécies criticamente em perigo, 55 em perigo e 15 espécies vulneráveis. Segundo Bozzini e Liou, (2012) as orquídeas podem ser consideradas bioindicadores ambientais, já que estas são encontradas em florestas em estágio clímax.

A dificuldade de propagação das sementes de orquídeas naturalmente, ocorre devido à falta de endosperma nas suas sementes, fazendo-se necessário a simbiose com fungos micorrízicas para que ocorra a germinação, estima-se que apenas 5% das sementes de orquídea germinem (PETERSON et al., 2004; DEARNALEY, 2007; ARDITTI, 1979). O cultivo *in vitro* é uma técnica que proporciona a propagação das orquídeas, visando assim diminuir o risco de extinção com a conservação *ex-situ*, além do desenvolvimento de estudos no âmbito fisiológico, relacionado ao crescimento e desenvolvimento das espécies (FERREIRA e SUZUKI, 2008), plantas com qualidade fitossanitária, permite alta produtividade em espaços relativamente curto de tempo.

Devido à importância econômica das orquídeas, tanto no mercado interno quanto no externo e sua importância biológica, se faz necessária a amplificação de estudos do conhecimento do desenvolvimento e crescimento *in vitro* destas plantas, visando atender a demanda do mercado buscando a obtenção de mudas de qualidade. O objetivo desse trabalho foi realizar a germinação de sementes de orquídeas *in vitro* sem a interação com micorrízicas.

METODOLOGIA

As cápsulas de sementes utilizadas foram retiradas de matrizes mantidas em estufas, onde foi realizada a polinização artificial. Após a coleta as sementes foram armazenadas em papel filtro em freezer a -20 °C. Para o desenvolvimento deste trabalho fez-se uso de quatro espécies de orquídeas sendo elas: 1) *Cattleya violacea*; 2) *Epidendrum radicans* 3) *Dendrobium nobile*, que foi realizada em duplicata, uma provinda de cada matriz.

As sementes passaram pelo processo de assepsia, que antecede a inoculação. As sementes foram colocadas em um recipiente com água e detergente neutro overnight, facilitando que esporos de fungos se soltem das sementes. E então estas foram levadas a câmara de fluxo laminar e colocadas em seringas descartáveis de 20mL, após empregar o êmbolo, foi feita a sucção de uma solução 20% de hipoclorito de sódio (NaOCl), produto comercial da marca Qboa®, deixando as sementes imersas por 5 minutos sob contínua agitação, após succionado uma solução de álcool etílico 70% por 3 minutos e então as sementes foram submetidas a lavagem, utilizando água destilada e autoclavada, sendo que este processo foi repetido por quatro vezes por cerca de 3 minutos em todo tempo sob agitação, conforme ilustrado na Figura 1. Após a quarta lavagem, foi succionado água novamente que compõe a solução (água+ sementes) solução usada na inoculação.

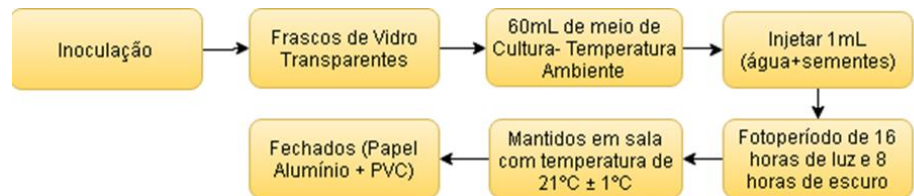
Figura 1 – Fluxograma esquemático do desenvolvimento da etapa de assepsia.



Fonte: Autoria própria (2019).

A inoculação foi realizada em frascos de vidro transparentes, contendo 60mL de meio de cultura à temperatura ambiente. Dentro dos frascos foi injetado cerca de 1mL da solução conforme a Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma esquemático do desenvolvimento da etapa de inoculação.



Fonte: Autoria própria (2019).

Os frascos foram fechados com papel alumínio e filme transparente de PVC, como pode ser observado na Figura 2. Os frascos foram mantidos em sala com temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Vidros transparentes fechados com papel alumínio e filme PVC.



Fonte: Autoria própria (2019).

Os meios de cultura utilizados foram Murashige & Skoog (1962) (MS) e Knudson com a seguinte constituição 2,0 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂; 0,500 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,500 g L⁻¹ de MgSO₄; 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)SO₄; 0,05 g L⁻¹ FeSO₄ e 0,015 g L⁻¹ de Mn(SO₄). Foram desenvolvidos três diferentes tratamentos sendo: (T1) MS puro; (T2) Knudson puro e (T3) Knudson com adição de vitaminas (Tiamina; Piridoxina; Ácido Nicotínico; Glicina) e micronutrientes (MnSO₄·4H₂O; ZnSO₄·7H₂O; H₃BO₃; KI; Na₂MoO₄·2H₂O; CuSO₄·5H₂O; CoCl₂·6H₂O; Ferro EDTA; Na₂EDTA; FeSO₄·7H₂O) que compõe o meio MS e (T4) Knudson com adição de 150mL de suco de cenoura

(obtido em processador sem adição de água). Todos os meios foram suplementados com 30g L-1 de sacarose e 10,5g L-1 de ágar com o pH ajustado em 5,7 antes da adição do ágar. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 120 °C a 1 atm de pressão durante 25 minutos.

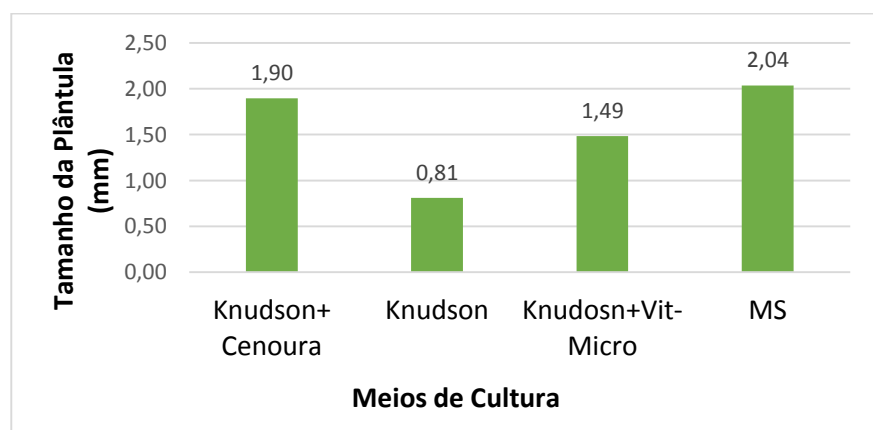
Foram avaliados o tamanho das plântulas, sendo que esta foi feita após a germinação das sementes, que ocorreu aproximadamente 40 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, bifatorial 4X4 (4 meios de cultura X 4 espécies de orquídea) foram realizadas cinco repetições. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (K-S) a análise de variância e comparados pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico BioEstat 5.3®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes das espécies *Cattleya violacea* e *Epidendrum radicans* não germinaram, fato que pode ser explicado devido à perda de viabilidade ao armazenamento. Pardo et al., (2006) estudando dezesseis espécies de orquídeas incluindo espécies do gênero *Epidendrum* e *Cattleya* com diferentes ensaios de armazenamento, citam que ocorre perda de viabilidade conforme se aumenta o período de armazenamento.

Quando avaliada uma das matrizes da espécie *Dendrobium nobile*, para ambos os tratamentos foi possível observar que houve diferença significativa entre os meios de cultura. O meio de cultura que promoveu maior média de crescimento foi o MS, com média de 2,04mm já a média mais baixa foi obtida no meio Knudson puro com 0,81mm, como é possível observar no Gráfico 1.

Gráfico 1—Gráfico com médias de tamanho de plântulas em diferentes meios.



Fonte: Autoria própria (2019).

Após a análise estatística foi possível observar diferença significativa entre os meios: Knudson puro e Knudson com adição de cenoura; entre Knudson puro e Knudson com adição de vitaminas e micronutrientes e entre Knudson puro e MS. Demonstrando assim que o meio de cultura Knudson puro não foi eficiente na

germinação e desenvolvimento da espécie *Dendrobium nobile* e sim o meio MS que proporcionou a melhor germinação e um bom desenvolvimento das plântulas, este fato pode ser explicado devido ao meio MS apresentar sua composição mais completa quando comparado ao meio Knudson puro.

Schneiders et al., (2012) utilizando meio de cultura MS básico, suplementado com 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, além de ágar, sacarose, tiamina e inositol, para espécies de *Cattleya forbesii* e *C. harrisonina*, citam que obtiveram bons resultados, que este promoveu o melhor desenvolvimento das espécies. Meio de cultura ½ MS suplementado com vitamina, inositol glicina, ágar e sacarose, para sementes da espécie *Dendrobium nobile* apresentou maior eficiência no crescimento das plântulas da espécie, quando comparado ao meio suplementado com carvão ativado (GALDINO et al., 2011).

CONCLUSÃO

Para sementes de *Cattleya* e *Epidendrum* não indica-se o armazenamento por longos períodos de tempo, devido à perda de viabilidade. Para a espécie *Dendrobium nobile* indica-se que para trabalhos com fins científicos utilize-se meio de cultura MS ou meio Knudson com adição de vitaminas e micronutrientes, já que estes apresentaram boa germinação e desenvolvimento. Já para fins comerciais indica-se o uso do meio Knudson com adição de suco de cenoura, já que este apresenta um custo menor quando comparado ao MS e apresenta resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research*, London, v. 7, p. 421-655, 1979.

DEARNALEY, J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582535>. Acessado em 09 Ago.2019.

GALDIANO-JÚNIOR, R. F.; NETO, P. C.; MANTOVANI, C. Crescimento in vitro de *Dendrobium nobile* Lindley com adição de carvão ativado. *Cientifica*, v. 40, p. 28-34, 2011. Disponível em: <https://docplayer.com.br/8805559-Crescimento-in-vitro-de-dendrobium-nobile-lindley-com-adicao-de-carvao-ativado.html>. Acessado em 06 Ago. 2019.

MARTINELLI, G., MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.1100 p.

PARDO, V. A., FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 92-98, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222006000100013&script=sci_abstract&tlng=pt. Acessado em 09 Ago. 2019.

PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B. & Melville, L.H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC Research Press.

SILVA, J. A. S., SILVA, A. B., ARAÚJO, T. H., ÁVILA, L. O. Germinação in vitro de sementes de orquídea (*Dendrobium nobile*). **Ornamental Horticulture**. V. 13, 2007. Disponível em: <https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/1410>. Acessado em: 06 Ago. 2019.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 604 p. Disponível em:

SCHNEIDERS, D., PESCADOR, R., BOOZ M. R., SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp. Orchidaceae). **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 59, n.2, p. 185-191, mar/abr, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2012000200006. Acessado em 06 Ago. 2019.