

Produção de mudas de orquídea a partir de sementeira *in vitro*

Production of orchid seedlings from *in vitro* seeding

RESUMO

Gabriela Zanella

gabrielazanella97@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Amanda de Souza Ferreira

amandaferreira@alunos.utfpr.edu.br

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

As orquídeas são conhecidas por produzirem sementes extremamente pequenas, isentas de endosperma funcional e incapazes de armazenar os nutrientes necessários à germinação, tornando-as dependentes da associação simbiótica com fungos micorrízicos; no entanto, mesmo em condições de simbiose a taxa de germinação é de apenas 5%. Além disso, orquídeas podem levar até dez anos para atingirem a maturidade reprodutiva, dificultando ainda mais a propagação natural das espécies. Como forma de aumentar a quantidade de mudas produzidas, é empregada a técnica de sementeira *in vitro*, que proporciona maiores taxas de germinação do que na natureza. Assim, o objetivo deste trabalho foi a sementeira *in vitro* das orquídeas *Cattleya* híbrida e *Epidendrum radicans* para avaliação do potencial de germinação das espécies *in vitro* e produção de novas mudas. Para isso, realizou-se a quebra de dormência e assepsia das sementes que posteriormente foram inoculadas em três meios de cultura distintos: Knudson, MS e ½ MS. Para a *Epidendrum radicans*, o meio de cultivo ½ MS foi o mais propício para germinação; já para a *Cattleya* híbrida, os resultados não foram satisfatórios, visto que a germinação não ocorreu.

PALAVRAS-CHAVE: Sementes. Germinação. Micorriza. *Cattleya*. *Epidendrum*.

ABSTRACT

Orchids are known to produce extremely small seeds, without functional endosperm and incapable of storing the necessary nutrients to germination, becoming dependent on symbiotic association with mycorrhizal fungi; however, even in symbiotic conditions the germination rate is only 5%. Besides, orchids can take up to ten years to reach the reproductive maturity, making the natural propagations of species even more difficult. As a way to increase the number of seedlings produced, *in vitro* seeding technique is used, which provides higher germinations rates than in nature. So, the objective of this work was the *in vitro* seeding of orchids *Cattleya* hybrid and *Epidendrum radicans* to evaluate the germination potential of species *in vitro* and production of new seedlings. For that, the dormancy break and asepsis of the seeds were performed, which were later inoculated in three different culture media: Knudson, MS e ½ MS. For *Epidendrum radicans*, the ½ MS culture medium was the most favorable for germination; for the *Cattleya* hybrid, the results were not satisfactory, since germination did not occur.

KEYWORDS: Seeds. Germination. Mycorrhiza. *Cattleya*. *Epidendrum*.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* é considerada a maior, mais evoluída e mais diversificada família de plantas florais, com aproximadamente 30.000 espécies distribuídas por todas as regiões vegetadas do planeta (DRESSLER, 1993; BARROS *et al.*, 2018). Suas características ornamentais contribuíram para a expansão da sua produção comercial, que atualmente representa uma parcela significativa do comércio mundial de flores (ZHANG, 2018).

Orquídeas são plantas de desenvolvimento lento, podendo levar de dois até dez anos para atingirem a maturidade reprodutiva (HEW; YONG, 2004). Suas sementes são conhecidas por serem extremamente pequenas, consistindo apenas de um embrião pouco diferenciado e não possuem endosperma funcional (BARROS; PINHEIRO; LOURENÇO, 2008; FRÁGUAS *et al.*, 2003). Devido a ausência de um endosperma, as sementes não possuem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação na natureza, que se torna dependente da associação simbiótica com fungos micorrízicos espécie-específicos, responsáveis por fornecer os nutrientes, minerais e vitaminas necessários ao processo (SOARES; RIBEIRO; SORGATO, 2017; YAM; ARDITTI, 2009); no entanto, mesmo em condições de simbiose, a taxa de germinação é de aproximadamente 5% (MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2008).

A técnica de sementeira *in vitro* é empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação (ANDRADE, 2002), como é o caso das orquídeas, promovendo maiores velocidades de desenvolvimento e maior eficiência na germinação, que pode chegar a 100% (MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2008; STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001). Além das vantagens citadas, a sementeira *in vitro* permite a recuperação de espécies em via de extinção. Com a comercialização dessas plantas aumentando ano a ano, muitas orquídeas são retiradas de seu habitat natural de forma ilegal, fazendo com que a propagação *in vitro* se tornasse um dos meios mais importante para preservação e reintrodução das orquídeas no seu ambiente natural (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Na propagação *in vitro*, as sementes são dispostas sobre o meio de cultura, que além de fornecer suporte físico, têm por objetivo suprir as exigências nutricionais da planta, visando atender as condições de crescimento do explante (LAMEIRA *et al.*, 2000). Após disposição no meio, as sementes são mantidas em salas de crescimento com condições controladas. Com o estabelecimento de fatores químicos e físicos é criado um ambiente artificial propício à germinação das sementes, que quando respondem a tais fatores são capazes de se desenvolver em uma planta completa (LAMEIRA *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2010).

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de realizar a sementeira *in vitro* das orquídeas *Cattleya* híbrida e *Epidendrum radicans* para avaliação do potencial de germinação das diferentes espécies e produção de novas mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este protocolo consistiu na elaboração de 3 meios nutritivos, Knudson, MS e ½ MS, conforme o quadro 1.

Quadro 1 – Constituição dos meios de cultura: Knudson, MS e ½ MS

Knudson	MS	½ MS
1,0 g de nitrato de cálcio	4,4 g de meio MS Basal Medium	2,2 g de meio MS Basal Medium
0,25 g de fosfato monobásico de potássio	20 g de sacarose	20 g de sacarose
0,25 g de sulfato de magnésio	8 g de ágar	8 g de ágar
0,5 g de sulfato de amônio	1 L de água	1 L de água
0,025 g de sulfato ferroso		
0,0075 g de sulfato de manganês		
20 g de sacarose		
8 g de ágar		
1 L de água		

Fonte: Autoria própria (2020)

Em seguida, o pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 1$, visto que são os ideais para o crescimento das orquídeas. Os meios foram fervidos em micro-ondas para solubilização do ágar, até obtenção de um meio de cultivo homogêneo. Após fervura, os meios foram transferidos para frascos de vidro, sendo 60 mL em cada recipiente, os quais foram fechados com papel alumínio e autoclavados dentro de sacos plásticos à temperatura de 120°C por 30 minutos.

No momento do trabalho de germinação realizou-se a limpeza do fluxo e demais materiais com álcool 70% e aplicação da luz UV (exceto as sementes). As sementes de *Epidendrum radicans* e *Cattleya* híbrida foram obtidas do acervo do Garden Matelândia, localizado em Matelândia-PR, e a germinação das orquídeas iniciou-se com a imersão das sementes em água por 24 horas. Ao iniciar o trabalho dentro do fluxo, a primeira etapa realizada foi a assepsia das sementes, começando com o preparo da solução de hipoclorito 20%, adicionando-se 10 mL de hipoclorito no tubo falcon e completando até 50 mL com água destilada autoclavada. Nesse tubo foram adicionadas as sementes que durante 5 minutos permaneceram em agitação leve no tubo, para completo alcance da solução. Ao término desse período, realizou-se uma tríplice lavagem em água para retirada total da solução, que foi iniciada ao escorrer a solução pela tampa entreaberta do tubo (com cuidado para não haver perda significativa de sementes); encheu-se o tubo com água, agitou-se com delicadeza, escorreu-se novamente, e reiniciou-se o processo, por 3 vezes, com água destilada autoclavada de diferentes frascos.

Em um segundo passo da assepsia, preparou-se a solução de álcool 70%, onde, em outro tubo falcon estéril adicionou-se 35 mL de álcool e completou-se até 50 mL com água. Essa solução foi homogênea e, nela adicionaram-se as sementes advindas da etapa anterior e agitou-se levemente por 5 minutos. Terminado o tempo, repetiu-se o ciclo anterior da tríplice lavagem para retirada

completa dos resíduos da solução, finalizando assim o processo de assepsia das sementes.

Na sequência, preparou-se a solução das sementes em cerca de 20 mL de água em um frasco e deu-se início a inoculação das sementes em 15 frascos de meio, sendo 5 de meio Knudson, 5 de meio ½ MS e 5 de meio MS (tanto na inoculação da *Epidendrum radicans*, quanto na inoculação da *Cattleya*). A solução preparada anteriormente foi sendo transferida para uma seringa, para que fosse realizada a inoculação de 1 mL da solução por frasco que, após essa etapa, foi devidamente embalado com 6 camadas de papel filme, etiquetado e armazenado na sala de cultivo com temperatura de 25°C e iluminação controlada com fotoperíodo de 16 horas de luz por lâmpada fluorescente branca de 16 W e 8 horas de escuro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 90 dias foram avaliados os 15 frascos inoculados com sementes da *Epidendrum radicans*, verificando que não houveram contaminações e que a germinação das sementes ocorreu em 6 frascos, de acordo com o quadro 2. Todas as repetições tiveram frascos nomeados A, B, C, D e E. O quadro apresenta apenas os frascos onde a germinação ocorreu.

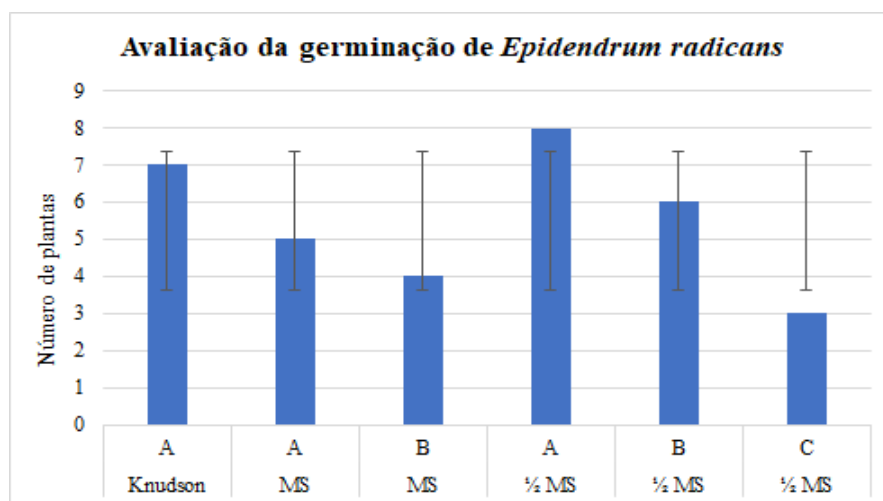
Quadro 2 – Avaliação da germinação de *Epidendrum radicans*

Meio	Frascos	Número de plantas
Knudson	A	7
MS	A	5
MS	B	4
½ MS	A	8
½ MS	B	6
½ MS	C	3

Fonte: Autoria Própria (2020)

Os resultados do quadro 1 são ilustrados no gráfico 1, juntamente com o desvio padrão.

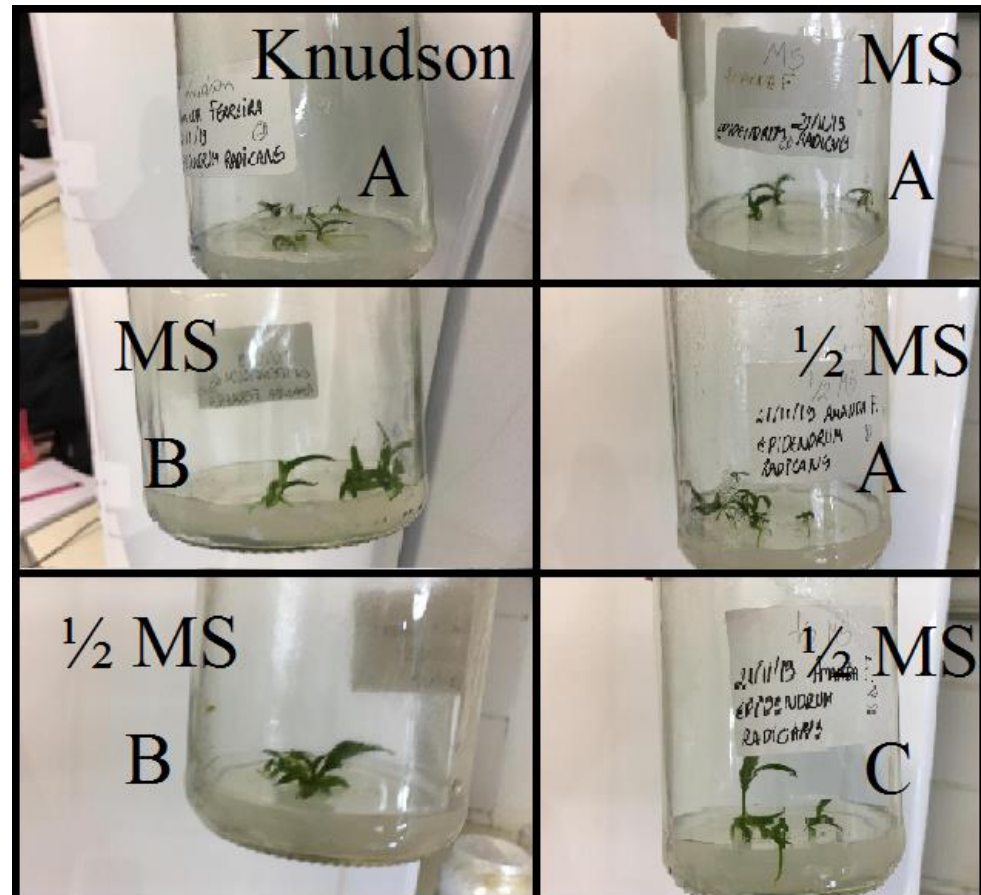
Gráfico 1 - Germinação da orquídea *Epidendrum radicans*



Fonte: Autoria própria (2020)

As plantas germinadas após 6 meses são demonstradas na figura 1.

Figura 1 - Fotos das plantas germinadas nos meios Knudson, MS (A e B) e ½ MS (A, B e C)



Fonte: Autoria Própria (2020)

Com base nas germinações descritas no quadro 2, foi possível determinar o meio ½ MS como sendo o mais propício para a germinação das sementes da espécie *Epidendrum radicans*, visto que 3 frascos germinaram com quantidades de plantas semelhantes aos demais, com 2 frascos germinados de MS e apenas 1 frasco do meio Knudson. De acordo com Torres (2006), isso ocorre porque os nutrientes em excesso também podem desidratar as sementes, tendo em vista o tamanho das mesmas, se justifica a necessidade da umidade do meio para germinação.

Em razão da pandemia da COVID-19, não foram realizados novos ensaios e os resultados obtidos devem ser complementados com um número maior de repetições.

Após três meses foram avaliados os meios inoculados com sementes de *Cattleya*, e o resultado obtido não se mostrou satisfatório, já que a germinação não ocorreu em nenhum dos frascos de cultivo. Esse resultado pode ter sido causado pelo fim da vida útil da semente, fazendo com que ela não estivesse mais apta a germinação, ou ainda por um armazenamento em condições inadequadas que ocasionou a perda da viabilidade da mesma. Os testes não puderam ser retomados com novas sementes em razão da pandemia da COVID-19.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a importância da técnica de semeadura *in vitro* na produção de plantas de difícil propagação natural e que possuem alta procura no comércio de flores. Esta técnica possibilita suprir as demandas comerciais, e o mais importante, possibilita a redução de um problema ambiental, através da recuperação de espécies em extinção. No caso da orquídea *Epidendrum radicans*, o meio nutritivo ½ MS, se mostrou superior ao demais durante a germinação. Para a orquídea *Cattleya*, a semeadura não foi alcançada, possivelmente ocasionado pelo fim da viabilidade das sementes.

REFERÊNCIAS

- DRESSLER, R. L. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Portland: Dioscorides Press, 1993.
- BARROS, F. *et al.* Checklist of the Orchidaceae from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, p. 287–296, 2018.
- ZHANG, S. *et al.* Physiological diversity of orchids. **Plant Diversity**, v. 40, n. 4, p. 196–208, 2018.
- HEW, C. S.; YONG, J. W. H. **A Brief Introduction to Orchid Morphology and Nomenclature**. 2 ed. Singapore: World Scientific, 2004.
- BARROS, F.; PINHEIRO, F.; LOURENÇO, R. A. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- FRÁGUAS, C.B. *et al.* Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, p.719-726, 2003.
- SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C. Germinação e crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. sem subcultivo em meio de cultura alternativo. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, n. 4, p. 487–492, 2017.
- YAM, T. W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–56, 2009.
- MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, p. 1397, 2008.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Embrapa Cerrado. Documentos 58. Planaltina, DF, p. 1-16, 2002.
- 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**, v. 7, p. 25-33, 2001.
- LAMEIRA *et al.* **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 41, 2000.
- TORRES, *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010.
- TORRES, A; CALDAS, L. S. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ. p. 183-260, 2006.