

## **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* COM SEMENTES DE *Cattleya eldorado* LINDEN, *Cattleya violacea* (KUNTH) ROLFE E *Cattleya luteola* LINDL. EM MEIOS DE CULTURA ASSIMBIÓTICOS**

Ariel Dotto BLIND<sup>1</sup>; Sidney Alberto do Nascimento FERREIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/ CNPq/ INPA; <sup>2</sup>Orientador CPCA/ INPA.

### **1. Introdução**

A família das orquídeas é imensa, provavelmente, a maior das angiospermas. Foram descritas na atualidade aproximadamente 725 gêneros, 30000 espécies e produzidos outros tantos híbridos. Habitam desde o nível do mar até aproximadamente 3000 metros de altitude podendo viver de modo epífita, rupícola ou de forma terrestre (Piccazio, 1986; Suttleworth *et al.*, 1997). O Brasil dispõe de grande biodiversidade de gêneros, espécies e variedades, principalmente das epífitas. Abriga em seu território a maioria das espécies do gênero *Cattleya* que possuem flores grandes, perfumadas e exóticas, com alto valor ornamental e de fácil cultivo. No estado do Amazonas são encontradas três espécies deste gênero, *C. eldorado*, *C. luteola* e *C. violacea*, que habitam áreas de campina, várzea e beira de rio, nas proximidades de Manaus, que florescem entre os meses de dezembro a fevereiro e estão sendo dizimadas pela destruição de seus habitats e coletas irregulares, predatórias, além do comércio ilegal que as tornam extintas e alguns lugares (Braga, 1977). Nas orquídeas as sementes estão protegidas dentro de uma cápsula, que no caso é o fruto. Quando da maturação, o fruto se rompe e expõe as sementes aos mais diversos tipos de agentes dispersores, principalmente o vento. Em apenas um fruto de orquídea é possível encontrar mais de 800000 sementes, porém na natureza, apenas 3, 4 sementes conseguem germinar e desenvolver-se adequadamente (Bach & Castro, *apud* Sousa *et al*, 2006). As sementes de orquídea diferenciam-se da maioria das outras espécies por não possuírem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação (Ramos, 1969). Todas as orquídeas epífitas apresentam sementes sem endosperma funcional. Desta forma, na natureza, são incapazes de germinar na ausência de fungos micorrízicos os quais fornecem nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário (Arditti, 1979; Pereira *et al.*, 2005). As orquídeas também se propagam vegetativamente, sendo necessários de dois a três anos para conseguir uma nova muda, o que não é muito conveniente. Partindo do princípio que as sementes germinam quando atacadas pelo fungo micorrizo, o professor norte americano Lewis Knudson descobriu, em 1922, a cultura chamada assimbiótica. Ele produziu em laboratório, com uma fórmula simples, os mesmos efeitos que o fungo causa as plantas provocando sua germinação. A propagação *in vitro* além de acelerar a taxa de germinação, permite a obtenção de uma maior quantidade de mudas com maior aproveitamento de sementes, pois, evita o "desperdício" que ocorre no ambiente quando as mesmas não conseguem germinar, ou devido ao seu desenvolvimento ser lento, muitas vezes, não atingem seu estado de maturação (Martini *et al.*, 2001).

Assim, esta pesquisa objetivou avaliar a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya eldorado*, *Cattleya violacea* e *Cattleya luteola* sob diferentes meios assimbióticos de cultivo.

### **2. Material e métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sementes da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em Manaus, AM. Inicialmente, foram coletadas cápsulas, pré-maduras, de *Cattleya luteola*, *Cattleya violacea* e *Cattleya eldorado*, que foram enviadas para o laboratório. Em seguida, foram extraídas as sementes e avaliada a viabilidade, e, ou, presença de embriões, por meio do teste de tetrazólio, a 1 %, durante 6 horas. Constatada a presença de embriões nas sementes de cada espécie, estas foram tratadas em solução de hipoclorito de sódio, a 0,5 %, durante 10 minutos. Depois, foram lavadas em água destilada-autoclavada para eliminar resíduos do hipoclorito. Para semeadura foram preparados três meios de cultura: meio orgânico, conforme Campos (2002), modificado (MO) - neste foram juntados e batidos no liquidificador 50 g de banana nanica semimadura (com casca), 50 g de mamão, 50 g de tomate cereja, 120 ml de água de coco-verde, 20 g de açúcar, 8 g de ágar-ágar, água destilada, até completar um litro de solução; fórmula b de Knudson (Silva, 1986) (MKB) - 1,00 g de nitrato de cálcio, 0,25 g de fosfato monopotássico, 0,05 g de sulfato de ferro, 0,50 g sulfato de amônio, 20,0 g de açúcar branco, 12 g de agar-agar, diluídos em um litro de água destilada; fórmula c de Knudson (Silva, 1986) (MKC) - 1,00 g de nitrato de cálcio, 0,25 g fosfato monobásico de potássio, 0,25 g sulfato de magnésio, 0,50 g sulfato de amônia, 0,025 g sulfato ferroso, 0,0075 g sulfato de manganês, 20,0 g açúcar branco, 12,0 g agar-agar, diluídos em um litro de água destilada. Cada um dos meios foi combinado com diferentes níveis de carvão ativado: 0 (zero), 1 e 2 g, por 1000 ml do meio. O pH de cada meio foi ajustado para 5,6. Após a

preparação, 50 ml dos diferentes meios foram colocados em frascos de 250 ml, fechados com três camadas de papel alumínio, e autoclavados a 121°C e 1 atm, por 15 minutos. Então, em cada frasco, contendo os diferentes substratos, foi feita a semeadura em câmara de fluxo de ar estéril, rompendo-se a camada do papel alumínio, utilizando uma seringa com agulha, de 20 ml, depositando-se duas gotas da "solução" semente/água, com aproximadamente  $100 \pm 10$  sementes. Após a semeadura, os frascos foram envolvidos com filme de PVC, para evitar contaminações. Esses foram colocados em câmara com temperatura de 25°C, com foto-período de 16 horas, utilizando lâmpada fluorescente. Para cada espécie, em ensaio independente, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 (meios de cultura) X 3 (níveis de carvão ativado), com 4 repetições.

### 3. Resultados e discussão

Houve contaminação, pelo menos em parte, de todos os meios de cultura e os primeiros sinais foram observados dois dias pós-semeadura com o surgimento e crescimento de colônias de fungos e bactérias (Figura 1A). Com isto, o delineamento experimental foi prejudicado, impedindo a realização de análise de variância e teste comparação de médias, conforme havia sido previsto. Nas parcelas que não foram contaminadas, as primeiras germinações das espécies estudadas foram observadas, em média, com 12 dias após a semeadura, caracterizadas pelo intumescimento dos embriões e coloração amarela pálido (Figura 1B). Com cerca de 45 dias pós-semeadura, foi possível visualizar nos meios MKB e MKC, sem contaminantes, os protocórmios bem diferenciados (em forma de pão) e de coloração esverdeada (Figura 1C). Após 60 dias foi visualizado o surgimento de primórdios foliares. As primeiras raízes, em algumas plântulas, surgiram com cerca de 90 dias, e em outras, neste período, havia emissão de raízes e folhas (Figura 1D). Na Figura 1E há plântulas com folhas e raízes, após 150 dias.

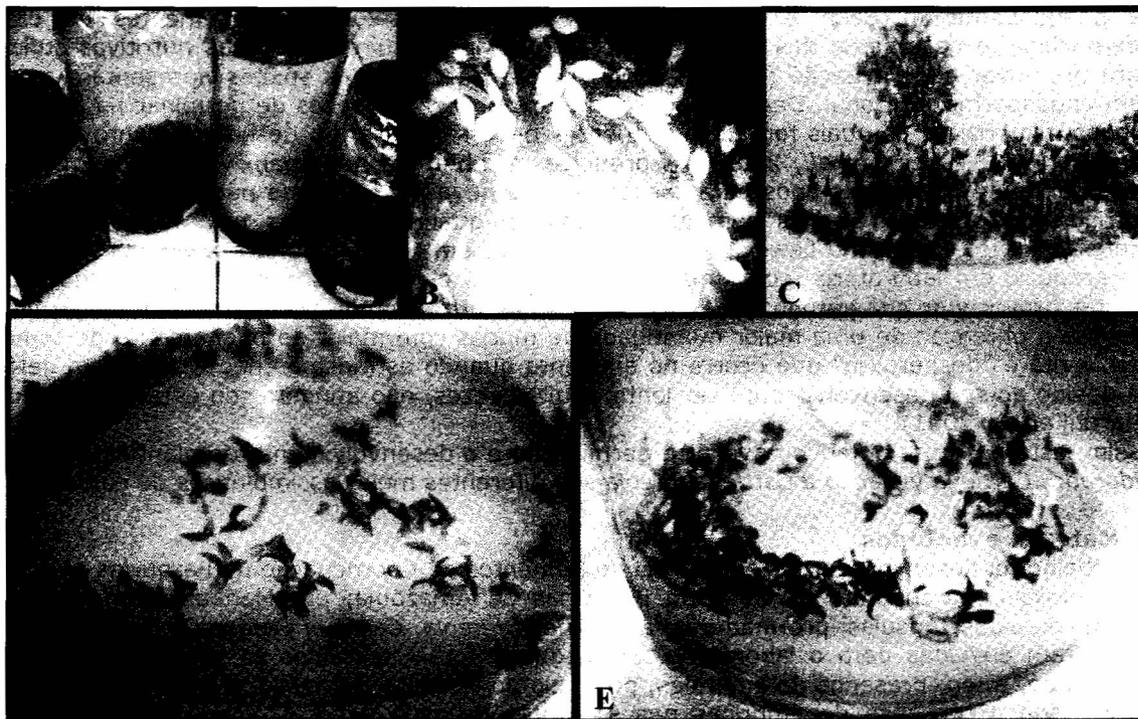


Figura 1 - Frascos contaminados por fungos e bactérias, 2 dias pós-semeadura (A); primeiros sinais germinativos visualizados após 12 dias da semeadura (B); protocórmios em formato de pão, 60 dias após a semeadura (C); plântulas com primórdios foliares e radiculares, 90 dias pós-semeadura (D); plântulas com três folhas e duas raízes em média, 150 dias pós-semeadura (E).

Apesar dos problemas de contaminação, foi possível estabelecer algumas inferências com respeito aos meios utilizados. O meio orgânico (MO) apresentou menor desempenho na germinação das três espécies estudadas. Visualmente, nos meios assimióticos MKB e MKC as plântulas, das três espécies em estudo, apresentaram diferenças de porte. O desenvolvimento das plântulas de *C. eldorado* demonstrou superioridade em relação às espécies *C. violacea* e *C. luteola* quanto à formação foliar em MKC. Aparentemente, os níveis de carvão ativado empregados (0 g, 1 g e 2 g por litro do meio de cultura) não influenciaram na germinação e na formação de folhas e raízes. A multiplicação de orquídeas via sementes, deve ser realizada, principalmente, em laboratórios

devidamente aparelhados, em vista das exigências de condições assépticas durante a fase de semeadura e desenvolvimento das plântulas. Outro fator importante nesse processo de multiplicação é o estado fitossanitário da planta doadora da cápsula, o qual pode interferir no sucesso da germinação *in vitro*.

#### 4. Conclusões

Considerando as condições em que os ensaios foram desenvolvidos, principalmente os problemas relacionados a contaminação, chegou-se as seguintes conclusões:

O meio orgânico apresentou menor desempenho na germinação de *Cattleya eldorado*, *Cattleya violacea* e *Cattleya luteola*;

Aparentemente, os níveis de carvão ativado empregados (0 g, 1 g e 2 g por litro do meio de cultura) não influenciaram na germinação e na formação de folhas e raízes das três espécies estudadas;

Dentre as espécies, *Cattleya eldorado* demonstrou superioridade no desenvolvimento foliar.

#### 5. Referências

Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Adv. Bot. Res.*, 7: 421-655.

Braga, P.I. 1977. Aspectos biológicos das Orquidaceae de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 7(2): 89. suplemento.

Campos, D.M. 2002. *Orquídeas: micropropagação e quimioterapia de meristemas*. 1a ed. Rio de Janeiro: Editora Expressão e Cultura.

Martini, P.C.; Willadino, L.; Alves, G.D.; Donato, V.M.T.S. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(10): 1319-1324.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L.; Chaer, G.M. 2005. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 191-197.

Picczazio, C. 1986. *Orquídeas: manuais práticos*. 1a ed. Rio de Janeiro: Editora três. 32 p.

Ramos, M.S.S. 1969. *A orquídea e sua reprodução pela semente*. Campinas: Indústria Gráfica Saraiva S.A.. 103p.

Silva, W. 1986. *Cultivo de orquídeas no Brasil*. 6 ed. 1.reimpr. São Paulo. Livraria Nobel S.A. 96p.

Souza, G.C.; Campos, M.R.C.; Clemente, P.L. 2006. Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Shomburgkia crispa*. In: IV Seminário de Iniciação Científica. Anápolis. *Anais do...* p.343-348.

Suttleworth, F.S.; Zim, H.S.; Dillon, G.W. 1997. *Orquídeas: guia dos orquidófilos*. 7.ed. Rio de Janeiro: Expressão e cultura. 158p.