



Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) sob diferentes métodos de sementeira

Charles M. A. Ribeiro¹; Melina E. Soares²; Lucia Ferreira³; Maiana M. Vilas Boas⁴; Pâmela R. P. C. Silva⁵; Newton Miranda Neto⁶; Alana M. C. Santos⁷; Joany A. Santos⁸

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento da *Cattleya loddigesii* Lindl, em cultivo *in vitro* sob três métodos de desinfecção de sementes, por meio dos parâmetros índice de germinação, comprimento de raiz, números de raízes e folhas, altura e massa seca das plântulas. As metodologias usadas: água destilada, seringa e cápsula verde. Os métodos água destilada e seringa obteve-se o melhor desenvolvimento das plântulas.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são muito apreciadas mundialmente, devido às características ornamentais, as orquídeas possuem relevante importância econômica, por isso são retiradas excessivamente da natureza, levando inúmeras espécies à extinção. O

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG - E-mail: charles94ambiental@hotmail.com

² Universidade Federal de Itajubá. Itajubá/MG - E-mail: melespanhol@yahoo.com.br

³ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: lucia.ferreira@ifsulde Minas.edu.br

⁴ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: maianavilasboas@hotmail.com

⁵ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: p_campi@hotmail.com

⁶ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: newton.mirandanetto@gmail.com

⁷ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: csa_lana@hotmail.com

⁸ Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Inconfidentes/MG – E-mail: joany-sgs@hotmail.com

gênero *Cattleya* é considerado um dos mais importantes, tendo em vista sua diversidade e seu valor ornamental, além de seu uso no desenvolvimento de híbridos interespecíficos e intergenéricos para fins comerciais (Van den Berg 2008).

Entre as orquídeas brasileiras, o gênero *Cattleya* é originário das regiões tropicais das Américas Central e do Sul composto de 48 espécies (Pridgeon 2006), mas em decorrência de recentes abordagens filogenéticas, este número pode ser ainda maior (Van den Berg 2008).

Entre as orquídeas do gênero *Cattleya*, amplamente utilizadas na obtenção de híbridos, está a *Cattleya loddigesii* Lindl. que encontra-se em risco de extinção no estado do Rio Grande do Sul, sendo sua atual situação desconhecida nos demais estados, onde é endêmica (Baptista & Longhi-Wagner 1998).

Nas duas últimas décadas, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas, para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (Ferreira & Suzuki, 2008). A germinação de sementes de orquídeas *in vitro* vem sendo realizada desde o início do século XIX, quando Knudson em 1922 descreveu a germinação das mesmas em meio de cultura asséptica, na ausência de fungos. Por esse motivo, as técnicas de cultivo *in vitro* tornaram-se bastante úteis para multiplicá-las com mais precisão. Portanto, sob o ponto de vista preservacionista, a utilização dessa ferramenta é importante, pois possibilita a obtenção de um grande número de plantas em um tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária, contribuindo, dessa forma, para a diminuição do risco de extinção (Suzuki & Ferreira 2007).

Sob este aspecto, a micropropagação proporcionou resultados expressivos com outras espécies classificadas “em risco”, citado por Roy et al. (2011). O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* da *Cattleya loddigesii*, por meio de diferentes métodos de desinfecção das sementes, afim de avaliar os parâmetros do índice de germinação, comprimento de raiz, números de raízes, altura e massa seca das plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Câmpus Inconfidentes. O material vegetal estudado na pesquisa foram sementes da

espécie *Cattleya loddigesii* cedidas por uma cultivadora da cidade de Inconfidentes, Minas Gerais.

O cultivo in vitro foi preparado em meio de cultura pelo produto em pó comercial B&G®, sendo seu conteúdo dissolvido em um litro de água destilada, sendo realizado cinco repetições para cada tratamento, em pH 6,0. Os meios foram gelificados com 10 g L⁻¹ de Agar a 121°C sobre pressão de 1 atm por 20 minutos, posteriormente permaneceram em repouso por 24 horas, antes de serem utilizados para o semeio.

As metodologias de desinfecção de sementes estudadas para o cultivo in vitro foram utilizadas oriundas de cápsula verde, cedida por uma cultivadora de orquídeas da cidade de Inconfidentes, Minas Gerais. A cápsula contendo as sementes possui 5 meses em grau de maturidade. Todo o processo de semeadura foi realizado em câmara de fluxo laminar. Foi utilizada 0,05 gramas de sementes para o estudo de desinfecção das sementes para cada tratamento.

A metodologia da água destilada foi realizada de acordo com Arditti e Ernest (1992), em que as sementes foram mergulhadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 5%, sendo submetidas à agitação durante cinco minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas s em álcool 70%, seguida de 4 lavagens com água destilada. Com volume de 1 ml contendo as sementes em água destilada da última lavagem foi utilizada para o semeio utilizando uma seringa para a aplicação.

O método da seringa foi realizado de acordo com o método tradicional utilizado por cultivadores de orquídeas proposto pela empresa B&G® flores. Neste método as sementes foram mergulhadas numa solução de 20 ml de hipoclorito de sódio a 5%, sendo um 1 ml desta solução contendo as sementes despejado sobre o meio de cultura.

No método cápsula verde foi utilizado um fruto da espécie denominado cápsula. A desinfecção da cápsula foi realizada antes do semeio. Para a desinfestação da cápsula, foi feita a lavagem em água corrente por cinco minutos utilizando-se uma peneira, após este procedimento para desinfecção estas ficaram em imersão em solução de álcool 70% e com hipoclorito de sódio (concentração de 1%) por um minuto.

Para a análise do desenvolvimento in vitro ocorreu em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Após 120 dias após a semeadura, houve as medições dos parâmetros altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), peso da

massa fresca (MF) e matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CMR) e maior folha (CMF). Após 19 dias do semeio, avaliou-se o índice de germinação das três metodologias usadas.

Para a análise estatística, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado para todas as repetições de cada metodologia de desinfecção. Foram utilizadas cinquenta plântulas de cada repetição para as medições dos parâmetros analisados.

As análises de comparação de médias de cada parâmetro foram realizadas por meio de Scott-Knott 5%, no programa computacional Sisvar (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice de germinação foi determinado pela fase de protocormo como a efetiva germinação de sementes, de acordo com as descrições de Arditti (1992) e Kraus *et al.* (2006) em que as sementes rompem seu tegumento liberando o embrião desenvolvendo o protocormo, pequenos folículos clorofilados como apresentado na Figura 1. O maior índice de germinação das sementes da *C. loddigesii* ocorreu para o método de desinfecção da seringa, seguido pelo método da água destilada e cápsula verde. A ocorrência do índice de germinação pode ser levada como parâmetro a quantidade de sementes inseridas no meio de cultura. As metodologias AD e MS foram diluídas em solução e posteriormente agitadas na seringa, fazendo com que tivesse uma separação e melhor espalhamento das sementes. Entretanto, o método da cápsula verde as sementes foram inseridas no meio de cultura diretamente, o qual impossibilitou uma maior homogeneidade do cultivo das sementes.



Figura 1. Protocormos de *Cattleya loddigesii* com 39 dias após a germinação, nas metodologias de tratamento das sementes: AD (A), MS (B) e CV (C).

O método de desinfecção das sementes da seringa apresentou desenvolvimento significativo das plântulas de *Cattleya loddigesii*, apresentou os maiores valores de

comprimento de raízes, número de raízes, altura e massa seca das plântulas (Figura 2). Observou-se que os métodos da água destilada e seringa apresentaram as plântulas maiores.

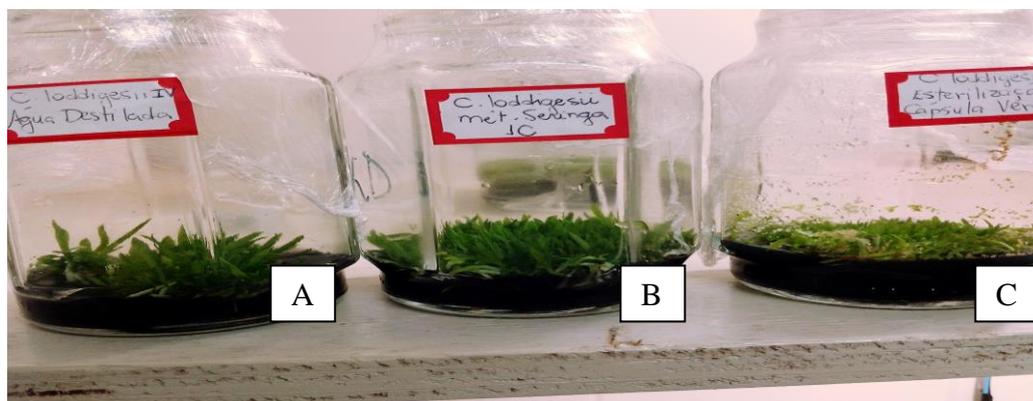


Figura 2. Plântulas de *Cattleya loddigesii* após 120 dias de germinação. Plântulas pelos métodos AD (A), MS (B) e CV (C).

Comparando-se o efeito das diferentes metodologias água destilada (AD), método da seringa (MS) e cápsula verde (CV) no desenvolvimento das plântulas (Tabela 1), verificou-se que nas metodologias água destilada e seringa não houve diferença significativa.

Tabela 1. Efeito dos diferentes métodos de semeadura da espécie *Cattleya loddigesii* após 120 dias da semeadura

Metodologias	Comprimento de raízes (cm)± desvio padrão	Número de raízes± desvio padrão	Número de folhas± desvio padrão	Altura das plântulas (cm)± desvio padrão	Massa seca das plântulas (g)± desvio padrão
AD	1,34 ± 0,32 A	1,47 ± 0,43 A	1,69 ± 0,45 A	2,27 ± 0,67 B	0,13± 0,02 A
CV	0,55 ± 0,04 B	0,98 ± 0,23 B	1,15± 0,10 B	1,53 ± 0,40 C	0,09± 0,05 B
MS	1,45± 0,43 A	1,45 ± 0,44 A	1,70 ± 0,63 A	2,71± 0,61 A	0,16± 0,04 A
Teste F	11,34	25,76	39,41	21,16	16,12

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, comparada na coluna para comprimento de raízes, número de raízes, número de folhas, altura das plântulas e massa seca, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$). AD = água destilada; CV= capsula verde; MS = método da seringa.

Pode ser pelo fato de que a agitação da água destilada e do hipoclorito de sódio na seringa possibilitou para uniformidade da concentração de sementes na distribuição das soluções. Isto é verificado por não apresentar diferença significativa para a maioria dos parâmetros avaliados, somente na altura das plântulas. Entretanto, a concentração de hipoclorito utilizado nas metodologias AD e MS foram iguais e a presença da água destilada não teve significância no desenvolvimento das

plântulas para os parâmetros avaliados, sendo assim de extrema necessidade a desinfecção com o hipoclorito de sódio.

CONCLUSÕES

A metodologia mais recomendada para o cultivo *in vitro* para a espécie *Cattleya loddigesii* seria o método da seringa e o método da água destilada, pois foram as metodologias que melhor corresponderam aos tratamentos de desinfecção, e apresentaram melhores resultados para os parâmetros avaliados de comprimento de raízes, número de raízes e folhas, altura e massa seca das plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNEST. R. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley & Sons. 1992. 682p.

BAPTISTA, L.R.M.; LONGHI-WAGNER, H.M. (Coord.). **Lista preliminar de espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sociedade de Botânica do Brasil, 1998. 72p.

FERREIRA, WM ; SUZUKI, RM. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA MIB, Baseia IG; LICHSTON JE (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, 2008. p.67-68.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: **REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**, 45, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

KRAUS *et al.* Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea*, 2006. v.33, p.177-184.

PRIDGEON, A. **The illustrated encyclopedia of orchids**. Timber Press, Portland, OR, USA. 2006. 304 pp.

ROY, A.R. et al. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**. 2011. v.128, p.325–331.

SUZUKI, R.M.; FERREIRA, W.M. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: L.M. BARBOSA; N.A. SANTOS-Jr, (orgs.). **A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**. 1 ed. Imprensa Oficial do Estado, São Paulo. 2007. p. 655-659.

VAN DEN BERG, C. 2008. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity*, 3: 3-12.