

UTILIZAÇÃO DE REGULADORES HORMONAIS NA GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS *IN VITRO* DE ORQUIDEAS

Gessé Almeida Santos*

Belisa Cristina Saito**

Diógenes de Paiva Monteiro**

Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez***

Patricia da Costa Zonetti****

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de germinação e a formação de plântulas de *Cattleya bicolor* (Orchidaceae) utilizando-se dos reguladores ácido á-naftalenoacético e ácido giberélico em tratamento de pré-embrição das sementes. Foi utilizado meio Knudson para o inóculo. As sementes foram previamente tratadas com os reguladores nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0 e 5,0mg/L por 24 horas. O tratamento com ácido giberélico 1,0 mg/L mostrou-se mais expressivo quanto ao número de plântulas formadas. A porcentagem de protocormos com gema foi maior no tratamento com ácido giberélico nas concentrações 2,0 e 5,0mg/L. A auxina não se mostrou efetiva no tratamento de pré-embrição das sementes de *Cattleya bicolor* no desenvolvimento “*in vitro*”.

PALAVRAS CHAVES: *Cattleya bicolor*; reguladores hormonais; cultivo “*in vitro*”.

USE OF HORMONAL REGULATORS IN THE GERMINATION AND DEVELOPMENT OF ORCHID SEEDLINGS IN VITRO

ABSTRACT: This work had the objective to assess the germination rate and development of seedlings of *Cattleya bicolor* (Orchidacea) using the regulators á-naphthaleneacetic acid and gibberelic acid in the seeds pre-imbibition treatment. Knudson's medium was employed for the inoculum. The seeds were previously treated with the regulators in the concentrations of 0.0; 1.0; 2.0 and 5.0 mg/L for 24 hours. The treatment with gibberelic acid was shown to be more effective in relation to the number of seedlings formed. The percentage of protocorms with buds was greater in the treatment with gibberelic acid in the concentrations of 2.0 and 5.0 mg/L. The auxine was not shown to be effective in the seeds pre-imbibition treatment of *Cattleya bicolor* in its development in vitro.

KEYWORDS: *Cattleya bicolor*; hormonal regulators; “in vitro” cultivation.

* Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas do CESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CESUMAR (PROBIC). E-mail: genespaiva@bol.com.br

** Acadêmicos do Curso de Ciências Biológicas do CESUMAR – Centro Universitário de Maringá. E-mail: belisasaito@gmail.com

*** Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, UEM. E-mail: milaneze@uem.br

**** Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do CESUMAR – Centro Universitário de Maringá. E-mail: patriciazonetti@cesumar.br

INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* originou-se na área fitogeográfica conhecida por Malásia, durante o período cretáceo, quando em sua maioria as famílias das angiospermas tornaram-se diferenciadas (GARAY, 1972). Tal família está mais bem representada nas regiões tropicais e subtropicais (STOUTAMIRE, 1964), podendo crescer como epífitas sobre árvores e arbustos ou ser rupícolas. Poucas são terrestres, algumas habitando os brejos ou o subsolo (PABST; DUNGS, 1975).

A estrutura e o tamanho das sementes das *Orchidaceae* estão entre as características mais peculiares da família (ARDITTI, 1967; DRESSLER, 1981). Para Stoutamire (1964), as sementes das orquídeas estão entre as de menor tamanho produzidas entre as fanerógamas e abrangem dimensões inferiores a 0,3mm, sendo raras aquelas com mais de 2 mm.

Withner (1959) estimou que o número de sementes por cápsula nas orquídeas tropicais é de aproximadamente 3,7 milhões, mas não como regra geral, uma vez que em algumas espécies foram encontradas cápsulas com apenas 376 sementes. Ackerman (1983) argumentou que a capacidade de produzir numerosas e pequenas sementes pode ser uma resposta às diversas pressões seletivas, podendo ocorrer tanto em plantas terrestres quanto em epífitas.

As sementes de orquídea diferenciam-se da maioria das outras espécies por não possuírem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação (RAMOS, 1969). Segundo Singh (1988 apud FRAGUAS *et al.*, 2003), a maior parte das orquídeas apresentam sementes sem endosperma funcional. Desta forma, as sementes na natureza são incapazes de germinar na ausência de fungos micorrízicos (ARDITTI, 1979). Esta simbiose mostra-se bastante delicada, podendo não acontecer com a aplicação de agrotóxicos ou em condições ambientais adversas.

Com as descobertas do pesquisador norte-americano Lewis Knudson nas décadas de vinte a quarenta, tornou-se possível a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de orquídeas "*in vitro*" assimbioticamente (na ausência do fungo), na presença de sais minerais e carboidratos solúveis em meio de cultura geleificado com ágar (MILANEZE, 1997). A partir de então o comércio de plântulas de orquídeas produzidas em laboratório aumentou significativamente, contribuindo para aliviar as pressões sobre as espécies nativas.

Os meios nutritivos utilizados no cultivo "*in vitro*" possuem a capacidade de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas e são formados por sais inorgânicos, possuindo ainda sacarose como fonte de carboidrato, aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas (BUTCHER; INGRAM, 1976; DIXON, 1985).

Vários protocolos de meio de cultivo foram propostos para as orquídeas (VUNAJOVIC *et al.*, 2000; MARTINI *et al.*, 2001; ROY; BANERJEE, 2002; PARK *et al.*, 2003); no entanto, mudanças no protocolo são necessárias para atender às necessidades específicas de cada material genético (CALDAS *et al.*, 1999).

As sementes para inóculo no sistema "*in vitro*" são coletadas do fruto (cápsula) em certo estágio de maturação. Tratando-se do gênero *Cattleya*, Campos (2000) afirma que a idade ideal da cápsula para a coleta de sementes é a de 180 dias, com variação de 150 a 210 dias. Segundo Suttleworth *et al.* (1994), o período ideal de coleta varia entre 300 e 360 dias; no entanto, sabe-se que este gênero possui muitas espécies com características próprias, o que faz supor que cada espécie se manifeste de maneira particular em relação à viabilidade das sementes.

Em geral, nas culturas "*in vitro*" utilizam-se reguladores de crescimento vegetal com funções auxínicas, como verificado por Barroso *et al.* (1990) e Miyoshi e Mii (1995). Hadley e Harvais (1968) descreveram que combinações de quinetina (citocinina) e ácido indolacético (auxina) permitem um bom desenvolvimento de orquídeas e que fatores externos, como luz e temperatura, podem antecipar o estágio de desenvolvimento.

O uso de reguladores químicos como tratamento pré-germinativo pode auxiliar no processo de germinação e desenvolvimento de protocormos. Miyoshi e Mii (1995), encontraram que o ácido á-naftalenoacético (ANA), Ethephon e 6-benzilaminopurina (BAP) promovem aumento na pré-germinação e formação de protocormos de *Calanthe discolor*.

As variações genéticas dentro da família *Orchidaceae* podem resultar em respostas diferentes quanto ao desenvolvimento com o uso de reguladores hormonais. Assim torna-se importante investigar os diferentes reguladores na espécie que se pretenda trabalhar, neste caso a espécie *Cattleya bicolor*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de germinação, a formação de protocormos e de plântulas "*in vitro*" de *Cattleya bicolor* (*Orchidaceae*) com a utilização dos reguladores vegetais: ácido á-naftalenoacético (ANA) e ácido giberélico (GA₃) como tratamento pré-germinativo das sementes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BOTÂNICO E TRATAMENTOS

Foram utilizadas sementes da espécie *Cattleya bicolor*, cedidas pelo Orquidário da Universidade Estadual de Maringá em maio de 2004. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de ácido á-naftalenoacético (ANA) e ácido giberélico (GA₃)

(1,0 2,0 e 5,0 mg/L) e um grupo-controle, onde as sementes foram embebidas de água destilada.

As sementes foram embebidas nas soluções dos respectivos tratamentos e armazenadas em frascos de 20mL, sem luminosidade por vinte e quatro horas. Após este período, estas foram inoculadas no meio de cultura "C" KNUDSON.

3 MEIO DE CULTURA E SEMEADURA "IN VITRO"

O meio de cultura utilizado foi o meio de cultura básico "C" KNUDSON (MILANEZE, 1997), contendo nitrato de cálcio, fosfato de potássio, manganês, cálcio, ferro, sulfato de amônio, ágar e sacarose. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 5,5. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave vertical, Phoenix®, modelo AV 75, por 15 minutos a 1 atm, posteriormente distribuído em frascos de 350 mL, em fluxo laminar, sendo que cada frasco recebeu 40 mL de meio de cultura.

A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar marca Quimis®. Para o inóculo, as sementes foram lavadas por três ou mais vezes em água destilada. No processo de lavagem, as sementes foram acondicionadas em pequenos frascos com tampa de borracha e foi retirada ao máximo a água nele contida, ficando apenas as sementes no fundo. Após realizado o processo de lavagem das sementes, foi acrescentada nos frascos solução de hipoclorito de sódio comercial, Q boa®, diluído a 13%. Com o auxílio de seringas, foi retirada a solução de hipoclorito e posteriormente as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada autoclavada. Foram retiradas com o auxílio da seringa pequenas porções das sementes já desinfetadas e estas foram semeadas nos meios de cultura anteriormente preparados e esterilizados. Em seguida ao processo de inoculação, os frascos foram lacrados com plástico *parafilm* para prevenir contaminação.

4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

A avaliação da germinação das sementes e do desenvolvimento inicial dos protocormos foi realizada após dois meses do inóculo das sementes no sistema "in vitro". Para avaliar a porcentagem de germinação, parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio 1%. Foram consideradas germinadas as sementes com embrião intumescido, isto é, em fase inicial de protocormo, corado (vivo) ou não (morto) pelo teste. Através dos dados obtidos foram determinadas as porcentagens de germinação das sementes com relação ao total de sementes contadas e a porcentagem de protocormos mortos. A porcentagem de protocormos vivos com gema foi contabilizada através do número de protocormos vivos com e sem gemas.

Após quatro meses de cultivo foi realizada a avaliação de formação das plântulas. Para esta avaliação foram consideradas a presença de folhas e a existência de raiz.

O ensaio foi delineado inteiramente ao acaso, cada tratamento foi repetido três vezes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias entre tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Cattleya bicolor* germinaram em aproximadamente 20 dias após inoculadas sobre qualquer um dos tratamentos. Neste período verificou-se aumento na estrutura geral dos embriões, passando para a fase de protocormo. Não houve diferença significativa para a porcentagem de germinação no grupo-controle e em todas as concentrações de ácido giberélico (GA₃), assim como na maior concentração de auxina (ácido á-naftalenoacético, ANA). Os tratamentos com menor concentração de ANA diferiram dos demais, apresentando efeito negativo no processo de germinação das sementes (Tabela 1).

Vários são os trabalhos com reguladores vegetais no desenvolvimento de plântulas de orquídeas (PRAXEDES *et al.*, 2000; ROY; BANERJEE, 2002; KRAPIEC *et al.*, 2003). No entanto, trabalhos com tratamentos de pré-embebição das sementes são raros. De acordo com Melo *et al.* (1979), o tratamento de sementes de espécies arbóreas com ácido giberélico e citocininas promove aumento na taxa de germinação. Pinheiro *et al.* (2001) também observaram efeito positivo do ácido giberélico na germinação de mangabeira. Neste trabalho foi encontrado que os tratamentos com ácido giberélico no processo de germinação não diferiram do controle.

Tratamentos	Características avaliadas		
	% de germinação das sementes	% protocormos mortos	% de protocormos com gema
controle	51,95 a	3,55 a	39,37 b
ANA 1 mg/L	31,28 b	3,99 a	24,28 c
ANA 2 mg/L	17,63 b	4,73 a	19,60 c
ANA 5 mg/L	49,06 a	3,50 a	37,72 b
GA 1 mg/L	65,42 a	1,99 b	45,27 b
GA 2 mg/L	45,01 a	0,62 b	72,22 a
GA 5 mg/L	41,34 a	0,57 b	69,43 a

Tabela 1. Características de germinação e formação de protocormos de sementes de *Cattleya bicolor* (Orchidaceae) pré-embebidas em solução com diferentes concentrações de auxina (ANA) e ácido giberélico (GA₃).

Médias seguidas das mesmas letras, na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey<5%)

Quando a semente de orquídea germina *“in vitro”* ela produz uma massa de células indiferenciadas chamada de protocormo. Mantendo-se as condições normais, o protocormo continuará a crescer por algumas semanas até começar a produzir raízes e folhas (MCKENDRICK, 2000). Os protocormos de orquídeas epífitas, como é o caso da espécie em estudo *Cattleya bicolor*, são normalmente verdes, o que lhes permite produzir seu próprio alimento.

Com relação à porcentagem de protocormos mortos, observa-se pela tabela 1 diferença estatística entre o grupo-controle e todas as concentrações de ácido giberélico (GA_3), tendo ocorrido a menor porcentagem de protocormos mortos quando as sementes foram embebidas com o regulador vegetal. Entre as concentrações de (GA_3) não houve diferença significativa. O tratamento com auxina (ANA) não foi efetivo, já que estatisticamente a porcentagem de protocormos mortos foi igual à do grupo-controle.

Segundo Taiz e Zeiger (2004), os efeitos fisiológicos do ácido giberélico em sementes estão relacionados à ativação do crescimento vegetativo do embrião e também ao enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe seu crescimento.

Os protocormos vivos se diferenciam, e ao passar do tempo do cultivo *“in vitro”* começam a formar gemas e posteriormente dão origem às plântulas. Os tratamentos com maior concentração de GA_3 (2 e 5 mg/L) proporcionaram maior formação de gemas em comparação com o controle e tratamento com a auxina, ácido á-naftalenoacético (ANA) (Tabela 1)

A auxina é um regulador importante para o processo de morfogênese dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2004), e tem sido descrita com efeito positivo em orquídeas na combinação com a citocinina no cultivo *“in vitro”* (MARTINI *et al.*, 2001; KRAPIEC *et al.*, 2003; PUCHOOA, 2004). Entretanto, nos protocolos de cultura de tecidos estes reguladores são adicionados ao meio de cultivo, e neste trabalho a proposta foi tratar as sementes antes do inóculo no sistema *“in vitro”*. De acordo com a tabela 1, a auxina não apresentou efeito favorável na formação de gemas, e na concentração mais baixa (1 mg/L) o número de protocormos com gemas estatisticamente apresentou-se igual ao do grupo-controle. Nas maiores concentrações de ANA (2 e 5 mg/L) o número de protocormos com gemas foi diferente estatisticamente e inferior ao do controle.

As sementes tratadas com ácido giberélico na concentração de 1 mg/L apresentaram um desenvolvimento mais acelerado do que as sementes do grupo-controle, apresentando, em média, 45 plântulas, contra 10 plântulas no controle, ao final de quatro meses de avaliação (Gráfico 1), diferença esta detectada estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) e Jesus *et al.* (2003), as giberelinas estimulam o

crescimento vegetal, agindo sobre o alongamento celular, sendo usadas freqüentemente no cultivo *“in vitro”* para o desenvolvimento inicial do embrião. O tratamento com auxina (ANA) não se mostrou efetivo, assim como as maiores concentrações de ácido giberélico (2 e 5 mg/L) (Gráfico 1).

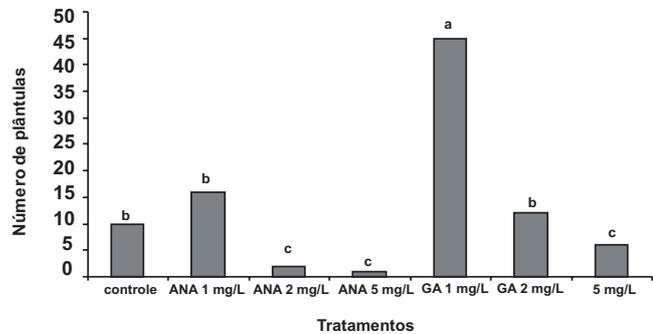


Gráfico 1. Número de plântulas obtidas de sementes de *Cattleya bicolor* embebidas em solução de reguladores vegetais após quatro meses de cultivo *“in vitro”* (ANA=ácido á-naftalenoacético; GA_3 = ácido giberélico).

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si (Tukey<5%)

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- a auxina (ácido á-naftalenoacético) não se mostrou efetiva no tratamento de pré-embebição das sementes de *Cattleya bicolor* no desenvolvimento *“in vitro”*;
- o pré-tratamento das sementes com ácido giberélico (GA_3) na concentração de 1 mg/L proporcionou maior número de plântulas formadas;
- as sementes pré-tratadas com ácido giberélico (GA_3) apresentaram um desenvolvimento mais acelerado do que as sementes do controle, além de menor número de protocormos mortos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, A. N. On the evidence for a primitivity epiphytic habit in orchid. **Syst. Bot.**, v. 8, 1983, p. 474-477.
- ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. **Adv. Bot. Res.**, v. 7, 1979, p. 421-655.
- _____. Factors affecting the germination of orchids seeds. **Bot. Rev.**, v. 33, n. 1, 1967, p. 1-97.

- BARROSO, J. et al. In vitro seed germination, differentiation and production of miniturbers from *Ophrys lutea* Ca., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. **Scientia Horticulturae**, v. 42, 1990, p. 329-37.
- BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. **Organs and embryos**. In Plant Tissue Culture. [s. l.]: Edwad Publishing Limited, 1976. p. 3-15.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultivo de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1999.
- CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático de reprodução**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2000. 127 p.
- DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON R. R. (ed). **Plant Cell Culture: A Pratical Approach**. Washington DC: IRL Press, 1985, p.1-20.
- DRESSLER, R. L. **The orchids and classification**. [s. l.]: Harvard University Press, 1981. 332 p.
- FRAGUAS, C. B. et al. Crescimento in vitro de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 292, 2003, p. 719-726.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae, II. **J. Arnold Arbor. Harv. Univ.**, v. 53, 1972, p. 203-215.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.
- HADLEY, G. HARVAIS, G. The effect of certam growth substances on asybiotic germination and development or Orchids pupurella. **New Phyhol**. v. 67, 1968, p. 44.
- JESUS, A. M. S. et. al. Cultivo in vitro de embriões zigoticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 288, 2003, p.183-189.
- KRAPIEC, P. V; MILANEZE, M. A.; MACHADO, M. F. P. S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Ochidaceae). **Acta Scientiarium**, v. 25, n. 1, 2003, p. 179-182.
- MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeura in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, 2001, p. 1319-1324.
- MCKENDRICK, S. **Manual para la germinacion in vitro de orquídeas**. [s. l.]: Ceiba Foundation for Tropical Conservation, 2000.
- MELO, J. T.; RIBEIRO, J. F; LIMA, V. L. G. F. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 1, 1979, p. 8-12.
- MILANEZE, M. A. **Estudos em orquídeas nativas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimiótico**. Rio Claro, 234 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista. 1997.
- MIYOSHI, K., MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 63, n. 3-4, 1995, p. 263-267.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**. Hildeshein: Brucke-Verlag., 1975, v. 1.
- PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v.164, 2003, p. 919-923.
- PINHEIRO, C. S. C. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa gomez*) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, 2001, p. 413-416.
- PRAXEDES, S. C. et al. Efeitos do BAP e do carvão ativado no desenvolvimento in vitro de plântulas de orquídeas. **Expressão**, v. 31, n. 1, 2000, p. 75-80.
- PUCHOOA, D. Comparison of Different Culture Media for the In Vitro Culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). **International Journal of Agriculture & Biology**. v. 6, n. 5, 2004, p. 884-888.
- RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Industria Gráfica Saraiva S.A., 1969. 103 p.
- ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**, v. 94, 2002, p. 181-192.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Mich. Bot.**, v. 3, n. 4, 1964, p. 104-19.

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. **Orquídeas**: guia dos orquídeófilos. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994. 158 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VUJANOVIC, V. et al. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany**, v. 86, 2000, p. 79-86.

WITHNER, C. L. Orchid physiology. In: WITHNER, C. L. (ed.). **The orchids**: a scientific survey. New York: Ronald Press, 1959. p. 155-188.