

## Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae) *in vitro*

**Jackeline Jorge**, Monique C. R. Abrão & Rogério Mamoru Suzuki

Núcleo de Pesquisa - Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP,  
rogeriomsuzuki@yahoo.com.br

**Resumo:** *Cattleya warneri* é uma orquídea de características ornamentais ameaçada de extinção. O cultivo *in vitro* auxilia na conservação de várias espécies vegetais dentre elas as orquídeas. O presente trabalho analisou a influência de diferentes meios de cultura na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial das plantas de *C. warneri* cultivadas *in vitro*. Os meios utilizados foram Knudson C (KC), Vacin e Went (VW), Murashige e Skoog (MS), e o meio MS com metade da concentração de nutrientes (MS½), todos suplementados com 2% de sacarose e micronutrientes do meio MS. O pH dos meios foi ajustado para  $5,8 \pm 0,05$  anterior a adição de 0,4% de ágar para a geleificação dos meios de cultura. Para cada meio de cultura foram utilizados quatro frascos e inoculadas cerca de 3000 sementes em cada frasco. Estes foram mantidos em sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h e luminosidade de  $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Foram obtidos a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de sementes que germinaram, utilizando-se 1300 e 700 sementes, respectivamente. O desenvolvimento inicial dos protocormos foi realizado utilizando-se 300 indivíduos para cada um dos diferentes meios. A análise da viabilidade mostrou que aproximadamente 88% das sementes eram viáveis. Vinte dias após os primeiros indícios da germinação foi observada maior porcentagem de sementes germinadas nos meios MS e MS½ (88% e 86%, respectivamente). Verificou-se após noventa e cento e vinte dias de cultivo que o meio KC é o mais indicado para o desenvolvimento inicial de *C. warneri*, pois 75,5% das sementes desenvolveram-se em plântulas com folhas e presença de pelo menos uma raiz. Deste modo, verificou-se que o meio favorável à germinação pode não ser benéfico para o desenvolvimento posterior. A germinação de *C. warneri* foi estimulada no meio MS e MS½; diferentemente, o desenvolvimento inicial pós-germinativo foi favorecido no meio KC.

**Palavras-Chave:** cultivo *in vitro*, germinação assimbiótica, meios de cultura, orquídea

### INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada a mais atraente entre o grupo das angiospermas devido à beleza de suas flores de diferentes cores e formas. Apresenta distribuição cosmopolita, compreende cerca de 800 gêneros e o número de espécies é de mais de 35.000, possuindo diferentes hábitos: terrícolas, epífitas ou rupícolas (Dunsterville & Garay 1976, Dressler 1993).

*Cattleya warneri* foi descrita por T. Moore em 1862; possui algumas características que estão próximas a espécie *Cattleya labiata* e sua floração ocorre durante o mês de junho e julho (Braem 1986). *C. warneri*, objeto de estudo, espécie endêmica dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, são plantas unifoliadas, possui pseudobulbos subclavados, a maioria das folhas é oblonga, porém algumas são quase arredondadas. As flores são grandes, 15-20 cm de diâmetro, aromáticas, vistosas e com coloração que varia do rosa escuro a púrpura ametista (Withner 1988) (Figura 1).



**Figura 1.** Aspecto das flores de *C. warneri*.

Por ser uma espécie ornamental e possuir elevado valor de mercado, há muito tempo vem sofrendo grande extrativismo da natureza, para fins lucrativos;



além disso, a destruição do habitat levou essa espécie a possuir alto risco de desaparecimento da natureza em futuro próximo, reconhecida pelo Ministério do Meio Ambiente em 2008.

O cultivo *in vitro* tem auxiliado na preservação de várias espécies vegetais dentre elas as orquídeas. Esta técnica possibilita o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas, estimulando o crescimento, e assim adquirindo o controle sobre o cultivo dessas espécies. Estudos que tenham como finalidade dominar os processos de propagação das orquídeas tornam-se extremamente importantes para que seja possível viabilizar a sua multiplicação em coleções vivas e possibilitar tanto a reintrodução na natureza como também a conservação daquelas espécies ameaçadas de extinção (Ferreira & Suzuki 2008).

O presente trabalho analisou a influência de diferentes meios de cultura na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial das plantas de *C. warneri* cultivadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* do Núcleo de Pesquisas - Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica (IBt), em São Paulo - SP.

O procedimento utilizado para a obtenção da porcentagem de sementes viáveis foi uma adaptação proposta por Lakon (1949) como descrito a seguir:

Anteriormente à desinfestação para a inoculação *in vitro*, uma pequena parcela das sementes foi coletada e imersa em solução aquosa de 1% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio durante 24 horas a 30°C no escuro. Foram preparadas três lâminas de vidro para a observação em estereomicroscópio e então obter a porcentagem de viabilidade das sementes, sendo consideradas viáveis as sementes com embrião corado de vermelho intenso.

As sementes foram embebidas em água destilada e esterilizada durante 30 minutos e posteriormente desinfestadas com 50mL de uma solução de 15% de hipoclorito de sódio comercial durante 10 minutos. Em seguida a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes em água destilada e esterilizada, sendo subsequentemente inoculadas em quatro meios de cultura: Knudson C (1946) (KC), Murashige & Skoog (1962) (MS) e MS com metade da concentração de macro e micronutrientes (MS½) e o meio Vacin e Went (1949) (VW), todos

suplementados com 2% de sacarose e micronutrientes do meio MS. Foram utilizadas quatro repetições de cada meio e três lotes de sementes, sendo inoculadas cerca de 3.000 sementes em cada meio. Estes foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa de 20µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O pH dos meios foi ajustado para 5,8±0,05 anterior a adição de 0,4% de ágar para a geleificação dos meios de cultura. Decorridos 20 dias da inoculação das sementes, foi obtido a porcentagem de germinação das sementes a partir da retirada de duas amostras de cada um dos frascos dos diferentes meios de cultura (KC, MS, MS½, VW), foram analisadas 1300 sementes para cada meio. Foram consideradas germinadas as sementes com embrião intumescido e clorofilado.

A análise do desenvolvimento inicial das sementes foi realizada aos três e aos quatro meses, procurando-se identificar as diferentes fases de desenvolvimento presentes em cada meio de cultura. Para tanto, pequenas porções de sementes em desenvolvimento foram retiradas aleatoriamente de cada frasco e analisadas em estereomicroscópio, totalizando cerca de 300 protocormos analisados para cada meio. A identificação foi efetuada conforme Suzuki *et al.* (2009), com pequenas modificações. (estádio 1) Sementes sem testa com protocormo de coloração verde, (estádio 2) protocormo com início da primeira folha e coloração verde, (estádio 3) protocormo com folhas e (estádio 4) plântula com folhas e pelo menos uma raiz.

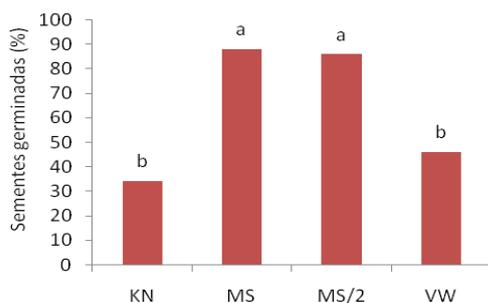
Os dados sobre porcentagem de sementes germinadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de viabilidade mostrou que aproximadamente 88% das sementes eram viáveis.

O início da germinação das sementes foi observado por meio de visualização do intumescimento dos embriões e produção de clorofila pelos protocormos. Vinte dias após os primeiros indícios da germinação, a maior porcentagem de sementes germinadas foi obtida nos meios MS e MS½ (88% e 86%, respectivamente) quando comparados aos meios KC e VW (34% e 46%, respectivamente) (Figura 2).

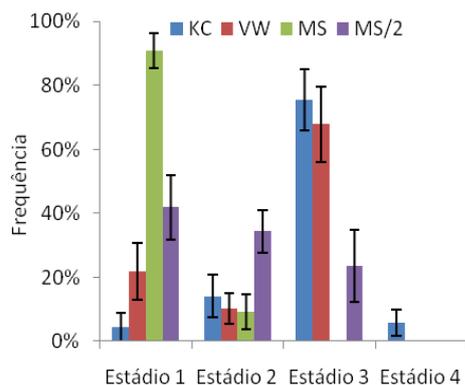
Suzuki *et al.* (2009), trabalhando com a espécie *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro, testou os mesmos meios de cultura exceto o MS½, e observaram que o meio de cultura KC propiciou a maior taxa de germinação de sementes de *H. tenebrosa* (67%).



**Figura 2.** Porcentagem de sementes germinadas de *C. warneri* obtidas vinte dias após a sementeira *in vitro*. Letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos, segundo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). (n=700)

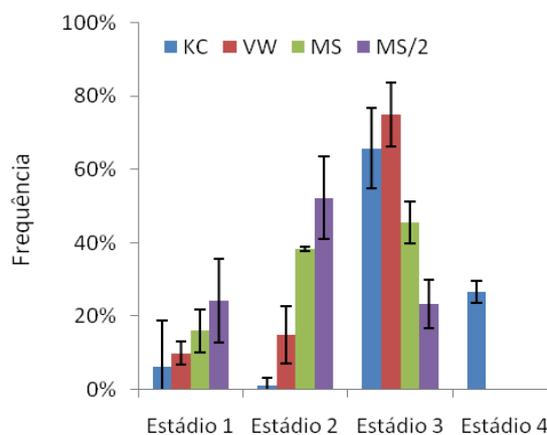
Esses resultados diferem do trabalho realizado por Suzuki *et al.* (2010) que obtiveram a maior porcentagem de germinação de sementes de *Cattleya bicolor* Lindley no meio VW (66,8%), enquanto que no meio MS foi de 60,8% e no KC de 48,5%.

Os resultados do desenvolvimento inicial dos protocormos decorridos noventa dias da sementeira *in vitro*, nos diferentes meios de cultura são apresentados na figura 3. É possível notar que a maior parte dos protocormos nos meios MS e MS/2 encontravam-se principalmente no estágio 1 (90,8 e 41,9% respectivamente). Com relação às sementes inoculadas no meio VW, a maioria destas foram identificadas como protocormos em estágio 3 (67,9%). As sementes germinadas no meio KC também apresentaram a maior porcentagem em estágio 3 (75,5%), entretanto, já houve desenvolvimento de plântulas em estágio 4 (5,9%), que denota um desenvolvimento mais rápido.



**Figura 3.** Efeitos de diferentes meios de cultura no desenvolvimento inicial de *C. warneri* três meses após a sementeira *in vitro*. (n=300)

Os resultados do desenvolvimento inicial dos protocormos, decorridos 120 dias da sementeira *in vitro*, são mostrados na figura 4. Verificou-se que os protocormos no meio MS/2 encontravam-se principalmente no estágio 2, cerca de 51,5%, e 24,3% dos protocormos ainda continuavam no primeiro estágio de desenvolvimento. O meio MS apresentou 16,1% de protocormos no primeiro estágio; 38,4% no estágio 2 e 45,5% no estágio 3. Esses resultados indicam que esses meios de cultura acarretam no desenvolvimento mais lento dos protocormos. Com relação às sementes inoculadas no meio VW a maior parte dos protocormos se encontrava no estágio 3 (75%). Apesar de ter apresentado uma alta porcentagem no estágio 3, não foram observadas plântulas com formação de raízes (estádio 4). Já as sementes inoculadas no meio KC, apresentaram predominantemente protocormos em estágio 3 (65,8%) e plântulas com raízes em estágio 4 (26,8%), caracterizando assim, um desenvolvimento inicial mais rápido das plântulas de *C. warneri*, dentre os meios de cultura estudados.



**Figura 4.** Efeitos de diferentes meios de cultura no desenvolvimento inicial de *C. warneri* quatro meses após a sementeira *in vitro*. (n=300).

A análise do desenvolvimento inicial realizada por Suzuki *et al.* (2009) em sementes de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro, após 120 dias, mostrou que entre os meios KC, MS e VW, o meio VW foi o que apresentou maior número de plântulas nos estádios mais avançados (40%) e o meio KC foi o que mostrou o desenvolvimento mais lento, pois os protocormos encontravam-se principalmente no estágio 1 e 2 (38% e 49%, respectivamente).

Diferentemente, no estudo realizado por Suzuki *et al.* (2010), decorridos 120 dias de sementeira *in vitro* de sementes de *Cattleya bicolor* Lindley, verificou-se que nenhum meio de cultura, dentre os utilizados

(KC, MS e VW) promoveu de forma acentuada o desenvolvimento desta espécie neste tempo de cultivo; diferenças apareceram apenas após 180 dias.

Stewart & Kane (2006) estudando o desenvolvimento inicial *in vitro* de sementes de *Habenaria macroceratitis*, verificaram após sete semanas, que os melhores resultados foram encontrados quando foi utilizado o meio VW, apresentando maior número de plântulas nos estádios mais avançados do processo de desenvolvimento dos protocormos quando comparados aos meios KC e MS.

Dutra *et al.* (2008) estudaram a germinação e o desenvolvimento inicial *in vitro* de sementes de *Bletia purpurea* e observaram que as plântulas cultivadas *in vitro* no meio VW, atingiram rápido desenvolvimento até o estágio de protocormos com duas folhas. Já no trabalho realizado por Dutra *et al.* (2009), com sementes de *Cyrtopodium punctatum*, o estágio mais avançado de plântulas com folhas foi obtido nos meios P723 e MS $\frac{1}{2}$ . O meio VW apresentou um estágio menos desenvolvido, apresentando plântulas apenas com os primórdios foliares e no meio KC não foi observado sequer a formação de plântulas. Por outro lado, na realização deste trabalho, o meio KC foi favorável tanto para a germinação quanto o desenvolvimento da espécie em estudo, sugerindo que este meio estimula mais rapidamente o desenvolvimento das plântulas de *C. warneri*.

Todos esses resultados evidenciam que a escolha do meio de cultura é extremamente importante para o sucesso da germinação de orquídeas.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que para a otimização da reprodução de *C. warneri* recomenda-se a utilização do meio MS ou MS $\frac{1}{2}$  para a germinação das sementes.

Posteriormente, os protocormos devem ser transferidos para o meio KC e mantidos nesse meio de cultura até o desenvolvimento de plântulas com raízes, para que seja iniciado o processo de aclimatização, após cerca de 12 meses de crescimento.

É importante analisar o efeito de diferentes meios de cultura para cada espécie, pois, há diferenças de exigência nutricional que são específicas de uma espécie e para cada fase de desenvolvimento desta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braem, G.J.** 1986. *Cattleya* – Band II: Die unifoliaten (einblättrigen) Cattleyen. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Dressler, R.L.** 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A.** 1976. Venezuelan orchids illustrated. Andre Deutsch, London.
- Dutra, D., Johnson, T.R., Kauth, P.J., Stewart, S.L., Kane, M.E. & Richardson, L.** 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. Plant Cell tissue and Organ Culture 94: 11-21.
- Dutra, D., Kane, M.E & Richardson, L.** 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. Plant Cell Tissue Organ Culture 96: 235-243.
- Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M.** 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: M.I.B. Loiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston (org.). Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil. Imagem Gráfica, Natal, pp. 67-68.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.
- Lakon G.** 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of seeds. Plant Physiology 24: 389-394.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E.** 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86: 147-158.
- Suzuki, R.M., Almeida, V., Pescador, R. & Ferreira, W.M.** 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). Hoehnea 37: 719-730.
- Suzuki, R.M., Moreira, V.C., Nakabashi, M. & Ferreira, W.M.** 2009. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. Hoehnea 36: 657-666.
- Vacin, E.F. & Went, F.W.** 1949. Some pH in nutrient solutions. Botanical Gazette 110: 605-617.
- Whitner, C.L.** 1988. The Cattleyas and their relatives, v. 1: The Cattleyas. Timber Press, Portland.