

Efeito do enriquecimento de meio nutritivo por complexos orgânicos e morfogênese *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner (ORCHIDACEAE).

Galdiano Júnior, Renato Fernandes¹; Gomes, Elisângela Soares²; Santos, Jaime Maia dos³; Lemos, Eliana Gertrudes de Macedo⁴

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas (FCAV-UNESP), Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s.n., CEP 14887-900, Jaboticabal, São Paulo (16) 3209 2600, e-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br; ²aluna do curso de Graduação em Ciências Biológicas da FCAV-UNESP, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s.n., CEP 14887-900, Jaboticabal, São Paulo (16) 3209 2600, e-mail: trinkabio2005@yahoo.com.br; ³Professor Assistente do Departamento de Fitossanidade (FCAV-UNESP), Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s.n., CEP 14887-900, Jaboticabal, São Paulo (16) 3209 2643, e-mail: jmsantos@fcav.unesp.br; ⁴Professora titular do Departamento de Tecnologia (FCAV-UNESP), Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s.n., CEP 14887-900, Jaboticabal, São Paulo (16) 3209 2675 ramal 217, e-mail: egerle@fcav.unesp.br.

INTRODUÇÃO

Cattleya walkeriana é de hábito epifítico, nativa da região central do Brasil, ocorrendo do Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, Sul de Minas Gerais e Sudoeste de Goiás e destaca-se na flora brasileira pela beleza de suas flores e o tamanho reduzido de seus órgãos vegetativos, características que despertam interesse de colecionadores e comerciantes (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE 2004). É considerada uma orquídea em vias de extinção e atribui-se a isto a destruição do hábitat pelas atividades antrópicas, tais como a coleta predatória e derrubada das matas que dão lugar à agropecuária.

O pequeno tamanho das sementes das orquídeas e a relativa indiferenciação de seus embriões oferecem material ideal para estudos morfogênicos e de nutrição (ARDITTI, 1967). Sob condições naturais, o processo de germinação pode ser estimulado pela formação de uma associação micorrízica ou, sob condições experimentais, por meio de cultura das sementes sobre meio definido (PRITCHARD, 1985).

As orquídeas crescem muito lentamente, e os métodos de multiplicação vegetativa usuais são pouco eficientes. São necessários aproximadamente cinco anos entre a semeadura e o florescimento de espécies de *Cattleya*, sendo a redução deste tempo de grande importância para cultivadores comerciais de orquídeas. Diversas mudanças de padrão de meios nutritivos foram propostas com o objetivo de otimizar o crescimento *in vitro*.

Os objetivos deste trabalho foram documentar a morfogênese de sementes de *Cattleya walkeriana* por microscopia eletrônica de varredura e avaliar o crescimento *in vitro* desta espécie de grande interesse comercial e ecológico, a partir do meio de cultura MS modificado por meio de suplementação com aditivos orgânicos recomendados para o cultivo *in vitro* de orquídeas.

METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista utilizando-se sementes de plantas oriundas do acervo do Orquidário da FCAV-UNESP. Cápsulas de sementes maduras foram desinfestadas no interior de câmara asséptica utilizando o protocolo de STANCATO e FARIA (1996). Em seguida, as cápsulas foram abertas no sentido de sua deiscência e uma pequena quantidade de sementes (0,1g) foi inoculada em frascos de 280 mL contendo 40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado, contendo 10 plântulas por frasco sob cinco repetições, totalizando 800 plântulas, entre os tratamentos que constam na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos utilizados e seus respectivos componentes

Trat.	Componentes
1	MS completo
2	MS completo + água de coco (20%)
3	MS completo + homogeneizado de banana (4%)
4	MS completo + carvão ativado (0,2%)
5	MS completo + água de coco (20%) + homogeneizado de banana (4%)
6	MS completo + água de coco (20%) + carvão ativado (0,2%)
7	MS completo + homogeneizado de banana (4%) + carvão ativado (0,2%)
8	MS completo + água de coco (20%) + homogeneizado de banana (4%) + carvão ativado (0,2%)
9	MS reduzido
10	MS reduzido + água de coco (20%)
11	MS reduzido + homogeneizado de banana (4%)
12	MS reduzido + carvão ativado (0,2%)
13	MS reduzido + água de coco (20%) + homogeneizado de banana (4%)
14	MS reduzido + água de coco (20%) + carvão ativado (0,2%)
15	MS reduzido + homogeneizado de banana (4%) + carvão ativado (0,2%)
16	MS reduzido + água de coco (20%) + homogeneizado de banana (4%) + carvão ativado (0,2%)

A partir dos 90 dias após a semeadura, plântulas de *Cattleya walkeriana* foram repicadas para outros frascos contendo os diferentes tratamentos. Passados 60 dias (ou 150 após o início do experimento), as plântulas foram novamente repicadas para o respectivo meio e permaneceram neste por mais 50 dias, quando então foram retiradas para as análises biométricas e de massa (200 dias depois do início do experimento).

Após a inoculação das sementes, os frascos foram vedados com filme de polietileno, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado e mantidos em câmara de crescimento à temperatura de 25°C, sob iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas de luz durante 200 dias, quando as plântulas foram retiradas dos frascos e mensuradas o número e comprimento da maior raiz, pesadas para análise da massa da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea e radicular. Os dados obtidos foram analisados pelo método de Tukey a 5% de probabilidade de erro e representados por meio de tabelas e gráficos para avaliação do crescimento das plântulas.

A partir da semeadura, quinzenalmente foram coletadas amostras em frascos contendo sementes e plântulas de *Cattleya walkeriana* (sob o tratamento 1) até o 60º dia de incubação, totalizando cinco amostragens. Estas foram fixadas em glutaraldeído a 3% em tampão de fosfato de potássio a 0,05M e pH 7,4. A seguir, foram lavadas seis vezes consecutivamente, com a mesma solução tampão sem o glutaraldeído, em um intervalo de 15 minutos e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%, no mesmo tampão, por cerca de 12 horas. Posteriormente, foram novamente lavados como no caso anterior, desidratados em uma série gradual crescente de concentração de acetona, sendo que o material foi mantido em cada concentração de acetona por 20 minutos e o último passo da série repetido duas vezes. A seguir, as amostras foram secas em secador de ponto crítico, utilizando-se CO₂, montadas em porta-espécimes apropriados, recobertas com cerca de 35 nm de ouro, observadas e eletromicrografadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado em 15kV (SANTOS e MAIA, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao crescimento radicular, a maior concentração do meio MS (tratamento 1, controle sem adição de complexo orgânico) foi prejudicial quando comparado ao meio MS reduzido (com metade da concentração dos macronutrientes) (Gráfico 1). STANCATO e FARIA (1996) verificaram que o melhor meio para o crescimento de *Laelia cinnabarina* foi o meio MS completo ou modificado com metade da concentração dos macronutrientes, sendo que este último proporcionou plântulas mais vigorosas.

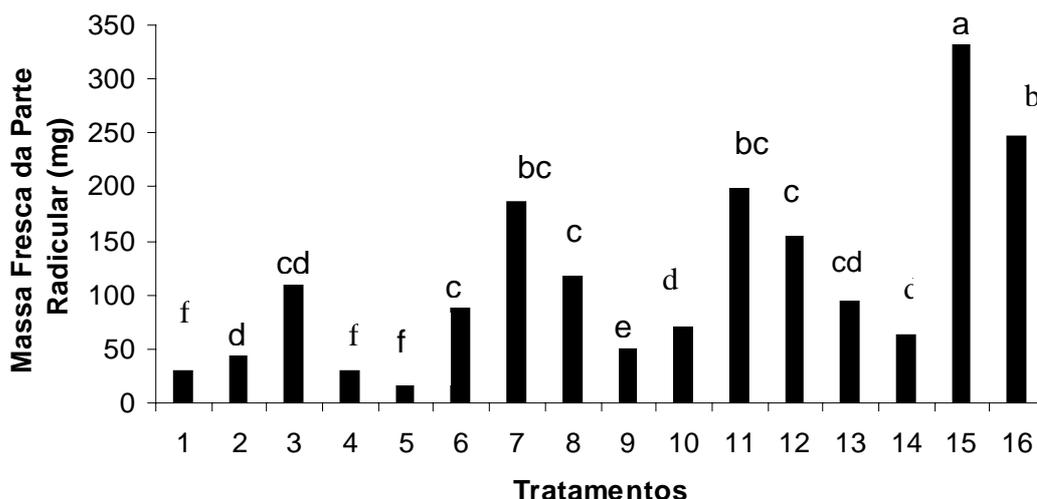


Gráfico 1. Massa Fresca da Parte Radicular, 200 dias após a semeadura de *Cattleya walkeriana* em diferentes meios nutritivos. UNESP – FCAV, Jaboticabal – SP, 2007.

* gráficos com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

Para o número de raízes, as maiores médias foram observadas no tratamento 11 (apesar de que a maior massa fresca esteja no tratamento 15), enquanto a menor média foi encontrada no tratamento 4. Os tratamentos 11 e 3 foram suplementados com 4% de homogeneizado de banana para os meios MS modificado e MS completo, respectivamente.

Segundo ARDITTI e ERNST (1993), a polpa de banana madura é rica em minerais, nitrogênio, ácidos orgânicos, lipídios e carboidratos. Entre os complexos orgânicos avaliados, este demonstrou ser o mais eficiente para o crescimento da parte radicular.

Plântulas com as maiores médias de massa fresca e seca da parte aérea foram encontradas no tratamento 11 (gráfico 2), e demonstra que o homogeneizado de banana também apresentou eficácia para o crescimento da parte aérea. Os complexos orgânicos água de coco a concentração de 20% (v/v) e carvão ativado a 0,2% como suplemento para o meio MS modificado, demonstrou ser pouco expressivo para o crescimento da parte aérea (tratamento 14) após 200 dias do início do experimento.

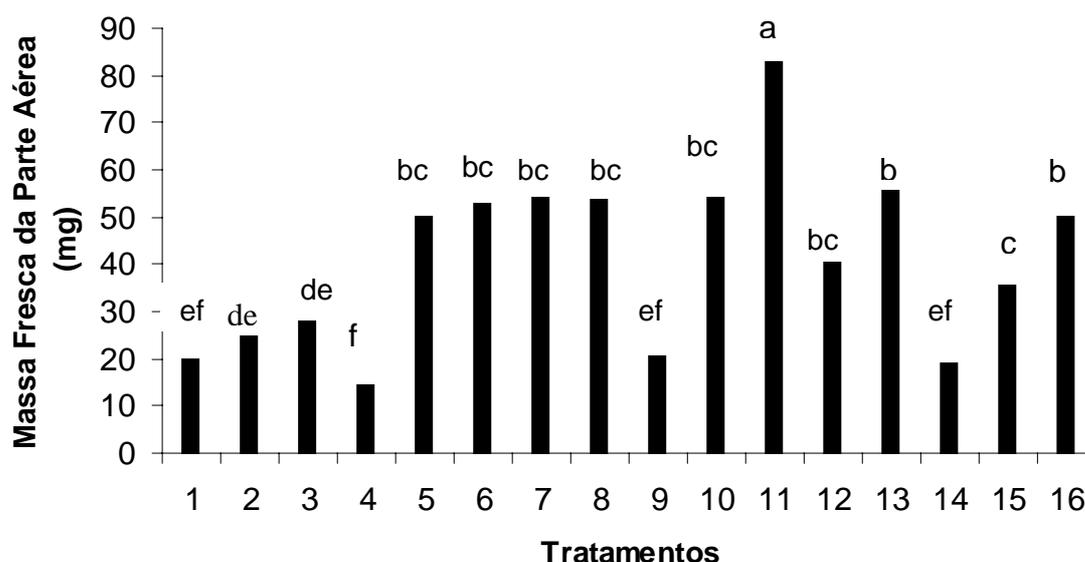


Gráfico 2. Massa Fresca da Parte Aérea sete meses após a semeadura de *Cattleya walkeriana* em diferentes meios nutritivos. UNESP – FCAV, Jaboticabal – SP, 2007.

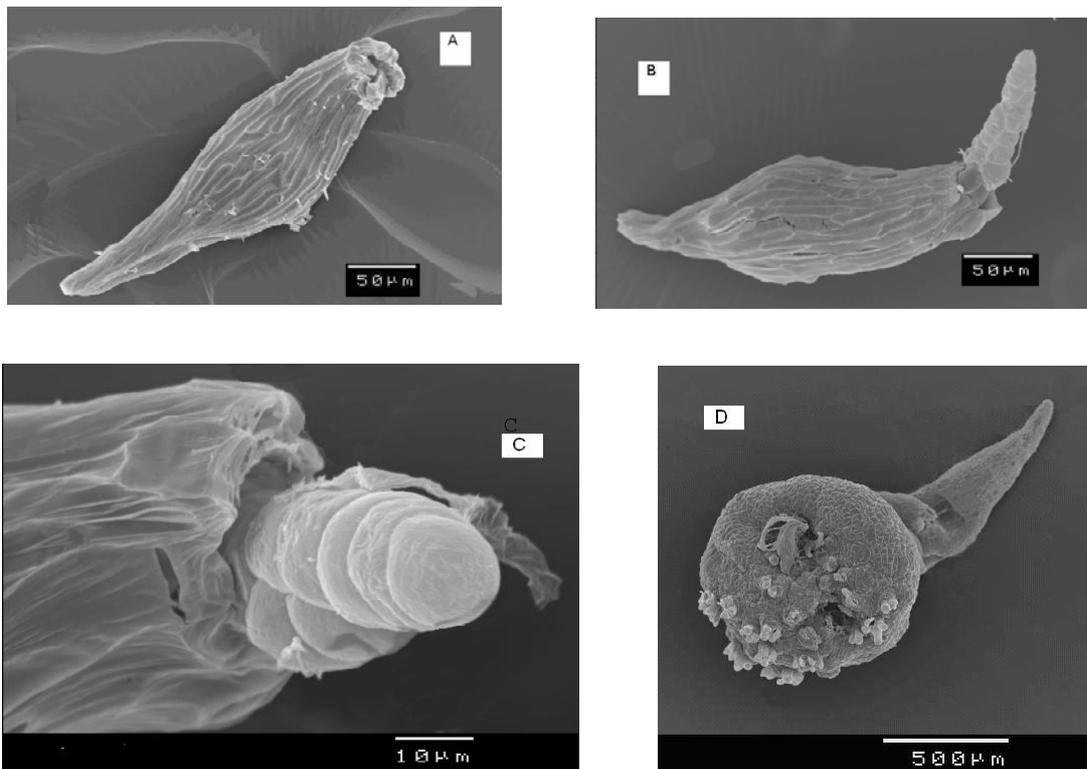
* gráficos com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

Cattleya walkeriana apresentou protocormos relativamente mais desenvolvidos, até os sessenta dias, nos tratamentos suplementados com água de coco e carvão ativado (combinados ou não no meio MS completo ou modificado) em relação ao observado nos demais, indicando que o efeito positivo para o crescimento aéreo proporcionado pela água de coco e carvão ativado não se estendeu até o final do experimento. MURDAD et al. (2006) concluiu, entretanto, que um meio contendo água de coco a concentração de 15% (v/v) e carvão ativado a $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ deve ser utilizado para a maior frequência de multiplicação de protocormos de *Phalaenopsis gigantea*.

Estes resultados estão em consonância com os de ICHIHASHI e ISLAM (1999), os quais concluíram que os efeitos promotores dos extratos orgânicos (extrato de mamão, milho e batata) variaram com o estágio de crescimento *in vitro* da orquídea híbrida *Doritaenopsis*, indicando que os requerimentos destes complexos orgânicos não são sempre constantes.

As sementes de *Cattleya walkeriana* apresentaram dimensões entre 300 μm de comprimento e 95 μm de largura e o tegumento, na semente madura desta orquídea constitui-se apenas da exotesta, contando com células mortas, transparentes e com paredes simples ou com ornamentação (Figura 8A, 8B). ARDITTI (1967), afirmou que a superfície externa das sementes de Orquidáceas é representada por uma testa reticulada, constituída por apenas uma camada de células alongadas. O padrão de reticulação pode ser espécie-específico ou gênero-específico, existindo uma considerável variabilidade nos detalhes estruturais, no que diz respeito ao grau de espessamento, transparência e escultura.

Figura 8. Aspecto geral da semente de *Cattleya walkeriana* (A, x350), e germinando aos 15 e 30 dias (B, x350; C, x1500), respectivamente. Protocormo de 45 dias com presença de pêlos epidérmicos e formação do folíolo (D, x50).



A partir de 45 dias após o início da germinação, *Cattleya walkeriana* apresentou protocormos contendo clorofila e pêlos epidérmicos posicionados em sua posição inferior (Figura 8D). KNUDSON (1950) observou estas características nos protocormos de *Cattleya* e *Laelia*, como também foi observado em *Vanda tricolor* e *Cymbidium* híbrido. O mesmo autor relatou também que espécies de *Cymbidium* não apresentaram pêlos absorventes antes que a primeira gema e a raiz estivessem formadas, demonstrando que a presença de pêlos e clorofila nos protocormos de Orchidaceae podem variar.

CONCLUSÕES

A concentração de sais macronutrientes MS reduzida pela metade apresentou maior eficiência para o crescimento de *Cattleya walkeriana* em relação ao meio MS completo; Água de coco e carvão ativado combinado mostraram-se eficazes apenas até a germinação; O meio de cultura MS reduzido suplementado com homogeneizado de banana (4%) apresentou as melhores médias para o número e comprimento de raízes. O meio MS reduzido suplementado com homogeneizado de banana (4%) e carvão ativado (0,2%) apresentou as melhores respostas para enraizamento e crescimento da parte aérea de *Cattleya walkeriana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v.33, n.1, p.1-97, 1967a.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**, 1993. New York: John Willey & Sons, p.13-58.
- KNUDSON, L. Germination of seeds of *Vanilla*. **American Journal of Botanic**, Oxford, v.37, p.214-247, 1950.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURDAD, R. et al. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. **Science Horticulturae**, v.111, p. 73-79, 2006.
- PRITCHARD, H.W. Determination of orchid seed viability using fluorescein diacetate: technical report. **Plant Cell Environment**, v. 8, p.727-730, 1985.
- SANTOS, J.M. DOS; MAIA, A.S. A SEM improved technique for studying host-pathogen interactions of sedentary nematodes and for documentation of perineal patterns of *Meloidogyne* ssp. **Acta Microscopy**, Caracas, v. 6, p. 562-563, 1997.
- SILVA, C.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (ORCHIDACEAE). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2004.
- STANCATO, G.C.; FARIA, R.T. In vitro growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae). **Lindleyana**, Palm Beach, v. 11, p. 41-43, 1996.

PALAVRAS-CHAVES:

Cattleya walkeriana; cultura *in vitro*; Morfogênese; ORCHIDACEAE