

## Micropropagação de *Bletia catenulata* Ruiz & Pav. (Orchidaceae)

Juliana Mary Kluthcouski<sup>1</sup>, Sérgio Tadeu Sibov<sup>2</sup>

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

juliana\_kluth@yahoo.com.br, stsibov@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** cultura de tecidos, orquídeas, propagação *in vitro*

### 1. INTRODUÇÃO

*Bletia catenulata* Ruiz & Pav. (Orchidaceae) é uma orquídea terrestre ou semi-epífita, com uma altura entre 100 e 150 cm com grande potencial ornamental. Esta espécie é nativa, mas não endêmica do Brasil, podendo ser encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Mata Atlântica e também no Cerrado.

A degradação de áreas do Cerrado pela ação antrópica, associada a algumas características de determinadas espécies da família Orchidaceae, como o baixo sucesso reprodutivo, habitat restrito ou ainda o fato de algumas espécies serem alvo de extrativismo predatório justificam a importância e a necessidade de estudos relacionados às características morfológicas, reprodutivas e fenológicas destas espécies, como também, estudos para cultivo, conservação, manejo, melhoramento e reintrodução destas espécies em seu habitat nativo.

A cultura de tecidos é frequentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993). A multiplicação de plantas *in vitro* tem início a partir de sementes ou pequenos pedaços de tecidos vegetais, denominados explantes. Após assepsia, são introduzidos em recipientes estéreis, sobre um meio sólido ou líquido contendo nutrientes e reguladores de crescimento, necessários ao estabelecimento do

---

- Revisado pelo orientador -

<sup>1</sup> Orientanda, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto de Ciência Biológicas, UFG;

<sup>2</sup> Orientador, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciência Biológicas, UFG;

explante e posterior multiplicação e desenvolvimento da planta *in vitro*. Ao serem retirados do ambiente de laboratório, os brotos desenvolvidos são aclimatizados em substratos especiais, sob luz solar controlada, formando mudas, destinadas às condições de cultivo. Esta tecnologia produz mudas matrizes de alta qualidade, vigor e sanidade (Grattapaglia & Machado, 1998).

## 2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *B. catenulata* além de verificar a capacidade morfogênica e propagativa das plântulas formadas, como contribuição a um futuro programa de melhoramento genético da espécie e ao desenvolvimento de protocolos para sua propagação em escala comercial.

## 3. METODOLOGIA

**Germinação *in vitro*:** os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Uma cápsula madura de *B. catenulata* foi coletada em julho de 2010, de um exemplar da espécie pertencente à Coleção de Orquídeas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG. Logo após a colheita, a cápsula foi desinfestada em solução de etanol 70% (v/v), por 1 min. e em seguida em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% (p/v) de cloro ativo, por 20 min. Em câmara de fluxo laminar a cápsula foi lavada três vezes em água autoclavada. Sementes foram retiradas da cápsula e inoculadas em quatro meios distintos: meio Knudson C (T1); meio MS (T2); meio MS com metade de macronutrientes (MS ½) (T3); meio com formulação simplificada com banana nanica, água de coco, e adubo foliar Peter's 20-20-20 (T4). O pH de todos os tratamentos foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição de ágar ( $7g.L^{-1}$ ) e autoclavados a  $120^{\circ}C$  a 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}C$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições, cada parcela consistiu de um frasco com 30 mL de meio contendo 0,4 g de sementes. A avaliação do número de protocormos foi feita semanalmente durante 90 dias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Estabelecimento das plântulas *in vitro*:** as plântulas, resultado da germinação das sementes, foram inoculadas em três meios distintos, para verificação do seu melhor desenvolvimento. Meio MS ½ com 1,5% de sacarose (15g) e água de coco 15% (v/v) (T0), meio MS ½ com água de coco 15% (v/v) (T1) e meio Knudson com 1,5% de sacarose (15g) e água de coco 15% (v/v) (T2); e. O pH de todos os tratamentos foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição de ágar ( $7g.L^{-1}$ ) e autoclavados a  $120^{\circ}C$  a 1 atm, por 20 minutos. Cada um com 60 repetições. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}C$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 60 repetições, em que cada parcela consistiu de um frasco com 20 ml de meio com uma plântula por frasco. A avaliação do número de brotos, tamanho do maior broto e presença de raízes foi feita a cada 30 dias durante 90 dias. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na avaliação realizada quinze dias após a inoculação notou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos no início da germinação das sementes de *B. catenulata*. Houve formação de protomeristemas em todos os tratamentos em aproximadamente 10 a 15% das sementes inoculadas. Nas avaliações posteriores observou-se também que o processo de germinação, em todos os tratamentos, não foi uniforme. Foram observados diferentes estádios de germinação ocorrendo simultaneamente. Com 21 dias pós a inoculação, os meios Knudson e MS ½ já apresentavam protocormos desenvolvidos em 12% e 5% das sementes inoculadas, respectivamente. Nesta mesma avaliação observou-se que os protomeristemas nos meios simplificados e MS completo apresentavam um desenvolvimento mais lento após o início da germinação. Aproximadamente 45 dias após a inoculação, 32% das sementes inoculadas já estavam com primórdios foliares já desenvolvidos no meio Knudson e 27% no meios MS ½. Neste período, apenas 8% das sementes inoculadas germinaram, e produziram primórdios foliares no meio MS completo e todo o material inoculado e germinado no meio simplificado não mais se desenvolveu e iniciou um processo de necrose (Tabela 1). Nas avaliações posteriores não houve mudanças significativas nos resultados obtidos entre os tratamentos.

Tabela 1. Valores médios de números de protocormos obtidos para a orquídea *Bletia catenulata* Ruiz & Pav. após 45 dias do início do experimento de germinação *in vitro*.

Tratamentos			
Knudson C	MS com metade dos macronutrientes	MS completo	Formulação simplificada
32,95 a <sup>1</sup>	27,80 a	8,6 b	0 c

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

No final do experimento de germinação constatou-se que em todos os tratamentos as plântulas que iniciaram o desenvolvimento, após a germinação, apresentavam algum grau de injúria nas folhas, variando de pontuações escuras a toda a folha necrosada. Estes sinais poderiam indicar algum problema fisiológico relacionado à osmolaridade do meio. Esta indicação ocorreu observando-se que tanto o meio Knudson quanto o meio MS ½ apresentaram uma concentração de sais inferior ao meio MS completo. Na comparação dos resultados de formação de protocormos, o meio MS completo foi o meio menos responsivo (excetuando-se o meio simplificado que não induziu qualquer protocormo).

Deste modo os três tratamentos que foram utilizados para o estabelecimento das plântulas de *B. catenulata in vitro* reduziram a quantidade de sais e também de sacarose nos meios. A concentração de sacarose também é um fator determinante na promoção de crescimento e é dependente do tipo de explante (Caldas et al., 1998). O excesso de sacarose inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento. Com a redução deste ingrediente no meio, a taxa fotossintética pode tornar-se mais adequada para seu desenvolvimento (Yamada & Sato, 1978).

Além disso, em todos os tratamentos foi utilizada a água de coco como suplementação ao meio de cultura. A água de coco fornece açúcares e outros metabólitos, contendo hormônios de crescimento como auxinas (Grattapaglia & Machado, 1998). Estas auxinas provocam alongamento das células das plântulas e atua nas áreas meristemáticas, proporcionando o seu crescimento apical e radicular, sendo importantes para o desenvolvimento de orquídeas (Magat & Agustin, 1997).

Para os três caracteres analisados os meios com menor quantidade de sacarose obtiveram as melhores respostas (Tabela 2). Os sinais de necrose nas folhas diminuíram, mas

não desapareceram por completo, embora este fato não tenha impedido o desenvolvimento das plântulas.

Tabela 2. Valores médios para número de brotos, tamanho do maior broto e número de raízes obtidos para a orquídea *Bletia catenulata* Ruiz & Pav. após 90 dias do início do experimento de estabelecimentos de plântulas *in vitro*.

Tratamentos <sup>1</sup>	Número de Brotos	Tamanho de maior broto	Número de raízes
T0	3,18 a <sup>2</sup>	1,36 b	0,95 ab
T1	2,25 b	1,58 b	0,73 b
T2	1,93 b	2,46 a	1,68 a

<sup>1</sup>T0: meio MS ½ com 1,5% de sacarose (15g) e água de coco 15% (v/v)

T1: meio MS ½ com água de coco 15% (v/v)

T2: meio Knudson com 1,5% de sacarose (15g) e água de coco 15% (v/v)

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de 5%.

A Tabela 2 mostra que o tratamento T0 proporcionou o maior número de brotos, embora de menor tamanho que o tratamento T2, e boa formação de raízes. Deste modo, optou-se por nova repicagem de todas as plântulas de *B. catenulata* produzidas *in vitro* em meio MS ½ com 1,5% de sacarose 15% de água de coco para aumentar a porcentagem de sobrevivência. Atualmente, as plântulas estão sendo acompanhadas nesta fase.

O próximo passo será montar novo experimento testando diferentes concentrações de reguladores de crescimento na tentativa de maior indução de raízes nestas plântulas, preparando-as para a fase final de aclimatização e estabelecimento em condições de vasos e substratos comerciais para cultivo em telados.

## 5. CONCLUSÕES

- Os meios Knudson C e MS ½ foram os melhores meios para a germinação *in vitro* de sementes de *B. catenulata* apresentando maior porcentagem de formação de protocormos e favorecendo o desenvolvimento posterior das plântulas.
- A espécie *B. catenulata* é sensível à osmolaridade do meio durante a fase de estabelecimento das plântulas *in vitro*. A diminuição da concentração de sacarose no meio e a suplementação do meio de cultura com água de coco proporcionou maior

sobrevivência das plântulas e foi benéfica para o crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. Micropropagation of orchids. New York: J. Wiley, 1993. p 682.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN. P. & FERREIRA. M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso. J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH,1998.P. 87-132.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p.183-260.

HOSSAIN, M.M. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances--an overview. Fitoterapia. 2011 Mar;82(2):102-40. Epub 2010 Sep 21.

MAGAT, S. S.; AGUSTIN, Y. T. V. The Philippine coconut industry. INTERNATIONAL CASHEW & COCONUT CONFERENCE, 1997, Tanzania,. *Proceedings...* Tanzânia, 1997. p. 21-27.

YAMADA,Y. & SATO,F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. Plant Cell Physiology, 19: 691-9, 1978.