

MEIO DE CULTURA DIO: UMA ALTERNATIVA SIMPLES E RÁPIDA PARA A PRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS – FASE III

Estudante: Rafaela Furlanetto Liberali (liberali@colegiojpa.com.br)

Orientador: Dionéia Schauen (dioneiasch@yahoo.com.br)

Escola: Colégio Estadual Jardim Porto Alegre

Resumo

As orquídeas são plantas de extrema importância econômica, atualmente o cultivo *in vitro* de orquídeas possibilita a produção de mudas para comércio, porém o custo de produção do meio de cultura muitas vezes inviabiliza a produção de mudas para pequenos produtores e para projetos que buscam reintroduzir orquídeas na natureza. Outra dificuldade enfrentada é o tempo de desenvolvimento da planta, sendo que dependendo da espécie pode demorar de 3 à 10 anos para que ocorra a primeira floração. A perda de exemplares pela contaminação do meio de cultura por fungos e bactérias é outra grande dificuldade enfrentada. Este projeto tem como objetivo diminuir prejuízos causados pela contaminação do meio de cultura por fungos e bactérias através da utilização de diferentes concentrações de Sulfato de cobre, Amoxicilina e Secnidazol, e diminuir o tempo de cultivo da orquídea através da utilização dos extratos de Babosa, Cedro, Grevílea, Pinus, Canafístula e nó de pinho. O projeto ainda se encontra em andamento e pode-se concluir por meio das avaliações semanais que a utilização de babosa é eficaz pois as diferentes concentrações germinaram antes do controle, tanto do meio alternativo quanto do meio de cultura comercial. Os testes de Sulfato de cobre e Secnidazol não se mostraram eficientes apresentaram germinação, já para a Amoxicilina não houve exemplares contaminados e já houve germinação, alcançando os resultados esperados, os testes de Cedro 50 gramas, Grevílea 300 gramas germinaram ao mesmo tempo que o controle comercial mais resultados serão obtidos a partir da análise estatística.

Palavras-chave: Contaminação; Extrato vegetal; Orquídeas; Tempo de cultivo.

Introdução e justificativa

As orquídeas estão presentes em quase todas as regiões da terra não sendo encontradas somente nos polos e desertos (SILVA, 2003). São plantas de extrema importância ornamental e industrial (AMARAL, 2007; BRUMANO, 2019), porém suas sementes tem tamanho extremamente reduzido, não possuem endosperma e cotilédone, que são indispensáveis para que haja o estágio inicial de germinação da semente (NASCIMENTO, 2007). Para que ocorra a germinação da semente em ambiente natural, a presença do fungo micorrízico se torna obrigatória, onde a semente entra em um processo de simbiose com o fungo, que auxilia a planta também em sua nutrição quando adulta (RASMUSSEN, 1995).

Em uma cápsula pode haver cerca de 1.300 á 4.000.000 de sementes (PIERIK, 1998), e apesar da grande quantidade de sementes apenas 5% de uma cápsula germina de maneira natural com a presença da micorríza (STOUTAMIRE, 1964). Devido sua grande importância para o comércio as orquídeas são retiradas de seus ambientes naturais, o que aliado á sua dificuldade de propagação pode levar a extinção de diversas espécies (SCHNEIDERS et al., 2012).

Em 1922 um método proposto por Lewis Knudson possibilitou a germinação das orquídeas sem a presença do fungo micorríza, utilizando sais minerais, açúcar e ágar a germinação das sementes foi abundante (GELL, 2002; DRONK, 2004). O cultivo *in vitro* tornou possível a produção de plantas de forma planejada, atendendo a demanda do mercado e possibilitando a reintrodução em áreas que sofreram com a coleta predatória (DRONK, 2004). Porém para a produção de orquídeas pelo método *in vitro* pode se tornar inviável para projetos de reintrodução na natureza e pequenos orquidófilos pelo alto custo de produção (SOUZA, 2015).

O tempo de desenvolvimento da orquídea também pode inviabilizar sua produção, visto que uma planta pode levar de 3 à 10 anos até sua primeira floração (FERREIRA, 2014). A utilização de hormônios reguladores de crescimento pode auxiliar no desenvolvimento da orquídea, diminuindo o tempo de cultivo, sendo comumente utilizadas as auxinas que estimulam o enraizamento através da produção de etileno (NASCIMENTO, 2007), as auxinas comumente utilizadas de forma isolada ou combinadas no meio são: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), e ácido naftalenoacético (ANA), sendo esses benéficos em baixas concentrações (RADMANN et al., 2002), as auxinas podem ser encontradas em diversas plantas entre elas a *Aloe vera*, podendo auxiliar de forma alternativa as auxinas comerciais no enraizamento, sendo uma solução econômica e ecológica (FADIA, 2017).

Outra grande dificuldade da propagação *in vitro* principalmente em escala comercial, é a contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias, que compete com nutrientes além de produzir substâncias que podem inibir o desenvolvimento da planta (GALDIANO JÚNIOR; MANTOVANI; LEMOS, 2012). Em biofábricas brasileiras a perda por contaminação pode chegar a 30%, sendo que em outros países ela pode variar de 10-35% (SILVA, 2014).

Objetivos

Este projeto tem como objetivo melhorar a produção de orquídeas diminuindo a perda

pela contaminação, custos de produção e tempo de cultivo das orquídeas in vitro, viabilizando a produção para pequenos produtores, e projetos que buscam o repovoamento de áreas que sofrem ou sofreram com o extrativismo predatório.

Metodologia

O preparo do meio de cultura e inserção das sementes foi realizado no laboratório de ciências do Colégio Estadual Jardim Porto Alegre. Inicialmente as flores foram fecundadas através da fecundação cruzada, e esperou-se o período aproximado de 180 a 270 dias para a formação da cápsula.

Os frascos e tampas metálicas foram higienizados utilizando água e detergente neutro, posteriormente filtros de papel foram recortados no tamanho aproximado da tampa metálica e inseridos nas mesmas, sendo que para o teste de sulfato de cobre os filtros foram previamente submetidos a soluções do mesmo, sendo utilizadas 10, 20, 30, e 40 gramas de sulfato de cobre diluídos em 100mL de água destilada, sendo a última concentração a saturada, utilizada por FERREIRA (2014). Os filtros foram imergidos na solução até que estivessem totalmente molhados.

Os frascos foram identificados utilizando etiquetas com o teste, tratamento, repetição e pH utilizados, sendo que para cada tratamento foram utilizadas 5 repetições.

Os extratos de Cedro, Pinus, Nó de Pinho, Grevílea, Canafístula, foram preparados utilizando as suas cascas, inicialmente foram pesadas as cascas nas concentrações de: 12,5; 25; 50; e 75g depositadas em frascos de vidro, adicionando 250mL de água destilada para cada pesagem extrato, após preparados os extratos foram deixados 7 dias ao abrigo da luz solar até que fosse realizado o preparo do meio.

O meio de cultura alternativo foi preparado sendo inicialmente pesados a banana nanica, açúcar, carvão ativado, bokashi e o ágar em uma balança de precisão, sendo suas pesagens definidas a partir de diversos testes posteriores realizados no colégio até a obtenção do meio. Os ingredientes com exceção do ágar foram processados em um moinho de pás juntamente com água destilada, sendo que para os testes utilizando os extratos de Cedro, Pinus, Nó de Pinho, Grevílea, Canafístula, foi adicionado os 250mL de extrato ao invés da água destilada.

Após processado o meio foi aquecido com o bico de bunsen, sendo medido a temperatura com o auxílio de um termômetro, sendo que a partir de 70°C o meio foi agitado para adicionar o ágar aos poucos. O meio de cultura MS foi preparado pipetando todas as vitaminas em um becker, acrescentando-se água destilada a solução, assim como no meio alternativo este foi levado ao bico de bunsen para que o ágar fosse adicionado. Para os testes feitos com Amoxicilina e Secnidazol os comprimidos foram pesados, e colocados 250 e 750mg para 250mL de meio de cultura.

Para o preparo do extrato, o gel da *Aloe vera* foi retirado da folha e processado com o auxílio de um garfo até que estivesse totalmente líquido, para posteriormente ser pipetado em beckers identificados com os tratamentos do teste, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 60mL, definidas a partir de teste de anos anteriores. Após pipetado o meio foi adicionado aos extratos até que se completassem 250mL. Após o resfriamento do meio o pH foi regulado em 5.6 utilizando um pHmetro de bolso, bicarbonato de sódio e ácido acético para regular. Aproximadamente 50mL de meio foram envazados nos frascos e estes foram autoclavados à 1.4 a.t.m na temperatura de 125°C durante 20 minutos.

As sementes foram inseridas após a estabilização do meio, para a inserção das sementes foi utilizada uma cuba de vidro com duas aberturas circulares, contendo uma lâmpada incandescente em seu interior como forma alternativa ao fluxo laminar. Foram utilizadas as cápsulas de *Dendrobium nobile* para o teste utilizando a babosa, para o teste utilizando o sulfato de cobre foi utilizada a orquídea *Dendrobium nobile* Lindl, já para os demais testes foi utilizada a cápsula da orquídea *Catasetum fimbriatum*. A cápsula foi submetida em uma solução de hipoclorito 12% durante 10 minutos, dentro da cuba de vidro foram realizadas lavagens consecutivas da cápsula com água destilada autoclavada e posteriormente esta foi partida com o auxílio de um bisturi próxima a lâmpada.

Os frascos foram higienizados, flambados e colocados dentro da cuba. Para a inserção os frascos foram abertos próximos a lâmpada. Após a inserção das sementes os frascos foram flambados e vedados com plástico filme.

Os frascos foram levados pra uma sala de cultivo no orquidário do colégio, onde semanalmente foram realizadas avaliações para observar a germinação dos frascos e possíveis contaminações por fungos e bactérias.

Ao final do projeto será realizada a análise estatística onde serão abertos 3 repetições de cada tratamento, sendo avaliadas dez plantas em cada frasco escolhidas aleatoriamente, totalizando 30 plantas por tratamento. Será observado o tamanho da planta, tamanho da folha, tamanho da raiz, número de folhas, número de raízes e número de bulbos.

Resultados e Discussão (ou subtítulo 4)

Estudo realizado por Ferreira, (2014) avaliou o desenvolvimento da orquídea *Epidendrum secundum*, *Cattleya warneri*, e *Encyclia pauciflora* x *Encyclia osmantha*, na sala de crescimento e casa de vegetação, usando tampas metálicas e de plástico, para diminuir a quantidade de contaminação utilizou sulfato de cobre na solução saturada nos filtros de papel. Os resultados obtidos contrariam os de Ferreira, pois não houve germinação nos frascos em que foram utilizadas as soluções de sulfato de cobre pois não houve germinação, além disso as tampas metálicas enferrujaram após a autoclavagem.

Em pesquisa realizada por Altizani Júnior et al, (2018) avaliou diferentes fertilizantes organominerais, para a estaquia de erva cidreira brasileira, variando diferentes proporções de terra, vermicomposto e areia, sendo um dos organominerais o AloeFértil® uma solução concentrada à base de *Aloe vera* e obtiveram bons resultados em concentrações específicas. Para a utilização da *Aloe vera* os resultados são satisfatórios até o momento, mostrando uma germinação mais desenvolvida nos frascos contendo o extrato vegetal comparados ao controle além de germinarem com antecedência, porém incompletos ainda sendo que as plantas ainda estão em processo de desenvolvimento, mais resultados serão obtidos a partir da análise estatística.

Para o teste utilizado a Amoxicilina não houve contaminação em nenhum exemplar, enquanto para o Secnidazol houve a contaminação de somente um frasco das cinco repetições para a concentração de 250mg, ambos os testes não apresentam resultados de germinação até o momento, tanto para os exemplares com testes quanto para o controle, alcançando os objetivos esperados se houver germinação.

Conclusões

O projeto encontra-se em andamento e mais resultados serão obtidos a partir da análise estatística. Resultados parciais mostram que a solução saturada de sulfato de cobre aplicada no filtro de papel que foi inserido na tampa inibe a contaminação por fungos e bactérias, contudo a semente não houve a germinação das sementes, o que indica retardo ou inibição da germinação de seu desenvolvimento.

Os testes utilizando o Nó de Pinho e as cascas de Cedro, Pinus, Grevílea, Canafístula, Amoxicilina e Secnidazol não apresentaram resultados parciais completos até o momento pois ainda não houve a germinação das sementes inseridas nos testes e controle.

Para a utilização da *Aloe vera* os resultados parciais são satisfatórios, apresentando plantas mais desenvolvidas nos frascos contendo o extrato vegetal comparados ao controle, mostrando um rápido desenvolvimento que pode diminuir o tempo de cultivo, porem incompletos ainda, sendo que as plantas estão em processo de crescimento, mais resultados serão obtidos a partir da análise estatística.

Referências

- ALTAZANI JÚNIOR, J. C.; MICHETTI, C. A.; SHINOZAKI, G. A.; LIMA, C. B.; BELLETTINI, N. M. T.; Substratos e fertilizante organomineral para a estaquia de erva cidreira brasileira. 2018. Graduação em Agronomia. **Universidade Estadual do Norte do Paraná – Bandeirantes** - PR.
- AMARAL, T. L. Manejo de adubação em *Phalaenopsis* (Orchidaceae) cultivado em fibra de coco. 2007. Tese (Mestrado em Produção vegetal) - **Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes** – RJ.
- BRUMANO, C. N. A trajetória social da baunilha do cerrado na cidade de Goiás/GO. 2019. Dissertação (Mestrado em Turismo). - **Universidade de Brasília**, Brasília – DF.
- DRONK, A. G. Meios de cultura e condições de luminosidade para cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba – PR.
- FADIA, E. S. Aloe vera Leaf Extract as a Potential Growth Enhancer for Populus Trees Grown Under *in vitro* Conditions. **American Journal of Plant Biology**. Vol. 2, No. 3, 2017, pp. 101-105. doi: 10.11648/j.ajpb.20170203.13 Received: May 18, 2017; Accepted: May 31, 2017; Published: July 5, 2017.
- FERREIRA, L. S. Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): crescimento e capacidade fotossintética. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção

vegetal) **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes – RJ.**

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden; Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizantes comercial. **Comunicata scientiae**, Teresina, v.3, n.3, p.210-214, mai. 2012.

GELL, J. A. Desenvolvimento inicial de três espécies Amazônicas de Orchidaceae em diferentes condições de cultivo: Aspectos morfo anatômicos. 2002. Dissertação (Mestrado em Recursos Genético Vegetais) – **Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.**

NASCIMENTO, M. G. A. Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* X *Cattleya harrisoniana*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - **Universidade Federal de Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA.**

PIERIK, R. L. M. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedium ciliolare* Pfitz *in vitro*. **Sci.Hort.** Amster, v. 34, n.1/2, p. 139-153, 1998.

RADMANN, E.; FACHINELLO, J. C. and PETERS, J. A.; Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. 2002, vol.24, n.3

RASMUSSEN, H.N. 1995. Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant. **Cambridge University Press.**

RUAS, I. L. Cultivo *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil: aspectos fisiológicos, anatômicos e genéticos. 2019. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - **Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA.**

SCHNEIDERS, Danieli; PESCADOR, Rosete; BOOZ, Maristela Raitz and SUZUKI, Rogério Mamoru. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Rev. Ceres** [online]. 2012, vol.59, n.2.

SILVA, E. F. Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya pastoral* x *Laeliocattleya amber* Glow. 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – **Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.**

SILVA, E. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth em meio de cultura com extratos. 2014. Dissertação (Mestrado em Recursos naturais) - **Universidade Federal de Roraima, Roraima – RR.**

SOUZA, G. R. B. Desenvolvimento *in vitro* e criopreservação de sementes de orquídeas. 2015. Tese (Doutorado em Agronomia) - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticaba – SP.**

STOUTAMIRE, W.P. Seeds and seedlings of native orchids. **Michigan botanist**, v. 3, p. 107-119, 1964.

VALDARES, R. B. S. Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados á subtribo Oncidiinae. 2009. Dissertação (Mestre em Ciências) – **Universidade Estadual de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba – SP.**