

AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES SUBSTITUINTES DO AGAR NA MICRO PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS

Estudante: Raquelly Izadora Miranda (miranda@colegiojpa.com.br),

Orientador: Dioneia Schauren (dioneiasch@yahoo.com.br)

Escola: Colégio Estadual Jardim Porto Alegre

Resumo

O estudo consiste em encontrar um substituinte para o Ágar, material de maior custo e muito utilizado no método de propagação in vitro de orquídeas. Com um substituinte de baixo custo é possível ajudar na propagação das orquídeas que tem uma baixa taxa de germinação nas natureza. As orquídeas são exalbusas, ou seja, elas não tem nutrientes reservas para se propagar sozinha, é necessário o auxílio do fungo micorriza que geralmente acaba não tendo na natureza por conta de fungicidas aplicados nas plantações. Já o ágar ele tem um preço muito alto e acaba não sendo acessível a certas instituições. Foram utilizadas sabugo de milho, casaca de ovo, casca de pinos cozida e in natura, grevilha cozida e in natura, eucalipto cozido e in natura para o preparo do meio de cultura substituindo o ágar. Após o preparo do meio foram inseridas sementes de *Dendrobium nobili* Lindl. Os frascos foram mantidos em casa de vegetação em temperatura e luminosidade natural. O estudo encontra-se em andamento contudo apresenta resultados preliminares surpreendentes.

Introdução e justificativa

As orquídeas são muito apreciadas mundialmente, embora nos países latino-americanos apresentem alto custo de produção (TRUJILLO & HERNÁNDEZ 1999). Na natureza, a semente de orquídea germina e se desenvolve mediante uma relação simbiótica com fungos micorrízicos, os quais fornecem os nutrientes necessários ao crescimento, até que a plântula possa realizar a fotossíntese e produzir o próprio alimento. Na cultura assimiótica, a semente é colocada em um frasco contendo um meio de cultura estéril, o qual proporciona a germinação e o crescimento das mudas, pois possui todos os nutrientes necessários (ARDITTI & ERNST, 1984).

A semeadura in vitro representa indispensável ferramenta para a propagação massal das principais espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (SANTOS et al. 2006). Entretanto, por falta de conhecimento e de informações em relação à nutrição dessas plantas, os orquicultores empregam meios de cultivo complexos, com diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento (VENTURA et al. 2002), elevando os custos desta forma de propagação.

Estudos in vitro realizados por Stancato, Bemelmans e Vegro (2001) e Pedroso-de Moraes et al. (2009), demonstram que a diminuição de custos é possível através da simplificação

dos meios de cultura atuais, principalmente com o emprego de fertilizantes como base de meios de cultura. Este tipo de procedimento tem como objetivo a produção em larga escala de alguns representantes do gênero *Dendrobium* que requerem condições de cultivo específicas.

Sabe-se que o ágar é um dos ingredientes mais caros do meio, pela quantidade utilizada, sendo de difícil substituição. Visando a reduzir o custo de produção têm-se testado substitutos para o ágar, como amido de milho ou de mandioca e sacarose. Estes têm apresentado interessantes resultados, principalmente na fase de enraizamento (FORTES et al., 1994 e FERRI & NACHTIGALL, 1996).

Desta forma o estudo consiste em encontrar um substituinte para o Ágar, testando materiais de menor custo e não convencionais no método de propagação *in vitro* de orquídeas. Utilizou-se como substituinte: sabugo de milho, casaca de ovo, casca de pinos cozida e in natura, grevêlea cozida e in natura, eucalipto cozido e in natura.

As orquídeas têm uma difícil propagação na natureza, desta forma a cada ano sua população nativa decai, sendo assim seria de grande importância ambiental encontrar uma forma mais barata e rápida de propagação. O Ágar detém um preço elevado, o que dificulta sua propagação, já que pequenos produtores e instituições não têm recursos suficientes para manter esses experimentos, desta forma procurou-se substituir o Ágar por 3 substâncias mais baratas e mais acessíveis

Problema: O ágar é um material pouco acessível para muitas instituições por conta de seu alto preço, desta forma este estudo tem com intuito substituí-lo por outras substâncias de menor custo. Além disso, as orquídeas tendem a ser exalbuminosas, ou seja, não possuem substâncias de reserva, por isto possuem baixas taxas de germinação em seu habitat natural, necessitando de um meio de cultura nutritivo, para aumentar sua população e diminuir seu custo de revenda.

Objetivos

O presente estudo foi concebido no laboratório de Ciências do Colégio Estadual Jardim Porto Alegre. Os frascos e tampas metálicas serão higienizados, posteriormente filtros de papel serão recortados no tamanho aproximado da tampa metálica e inseridos nas mesmas. Os frascos serão identificados com o teste, tratamento, repetição e pH utilizados.

Metodologia

Sendo que para cada tratamento serão utilizadas 5 repetições. Serão pesados a banana nanica, açúcar, carvão ativado, bokashi em uma balança de precisão, posteriormente todos os

ingredientes com exceção do ágar serão processados em um moinho de pás com água destilada. Antes do meio serem distribuídos nos frascos colocou-se dentro destes em diferentes pesos, sabugo de milho, casaca de ovo, casca de pinos cozida e in natura, grevílea cozida e in natura, eucalipto cozido e in natura para o preparo de o preparo do meio de cultura substituindo o ágar. Adicionou-se o Ágar apenas no meio Controle. Todos os testes serão levados ao bico de busen até o meio atingir 70°C e o ágar ser adicionado. Será esperado o resfriamento do meio para regular o pH em 5.6 utilizando um pHmetro de bolso, bicarbonato de sódio e ácido acético. Aproximadamente 50mL de meio serão envazados nos frascos e autoclavados a 5.4 a.t.m durante 20 minutos. 4 Para a inserção das sementes será utilizada uma cuba de vidro com duas aberturas circulares, contendo uma lâmpada em seu interior. A cápsula será submetida em uma solução de hipoclorito 12% durante 10 minutos, após esse período serão realizadas lavagens consecutivas com água destilada e a capsula será partida com o auxílio de um bisturi. Os frascos serão flambados antes e depois da inserção de sementes e vedados com plástico filme e posteriormente serão levados pra sala de cultivo no orquidário do colégio, onde semanalmente serão 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 para cada tratamento, sendo avaliadas dez plantas em cada frasco escolhidas aleatoriamente. Será observado o tamanho da planta, tamanho da folha, tamanho da raiz, número de folhas, número de raízes e número de bulbos.

O presente estudo foi concebido no laboratório de Ciências do Colégio Estadual Jardim Porto Alegre. Os frascos e tampas metálicas serão higienizados, posteriormente filtros de papel serão recortados no tamanho aproximado da tampa metálica e inseridos nas mesmas. Os frascos serão identificados com o teste, tratamento, repetição e pH utilizados. Sendo que para cada tratamento serão utilizadas 5 repetições. Serão pesados a banana nanica, açúcar, carvão ativado, bokashi em uma balança de precisão, posteriormente todos os ingredientes com exceção do ágar serão processados em um moinho de pás com água destilada. Antes do meio serem distribuídos nos frascos colocou-se dentro destes em diferentes pesos, sabugo de milho, casaca de ovo, casca de pinos cozida e in natura, grevílea cozida e in natura, eucalipto cozido e in natura para o preparo de o preparo do meio de cultura substituindo o ágar. Adicionou-se o Ágar apenas no meio Controle. Todos os testes serão levados ao bico de busen até o meio atingir 70°C e o ágar ser adicionado. Será esperado o resfriamento do meio para regular o pH em 5.6 utilizando um pHmetro de bolso, bicarbonato de sódio e ácido acético. Aproximadamente 50mL de meio serão envazados nos frascos e autoclavados a 5.4 a.t.m durante 20 minutos. 4 Para a inserção das

sementes será utilizada uma cuba de vidro com duas aberturas circulares, contendo uma lâmpada em seu interior. A cápsula será submetida em uma solução de hipoclorito 12% durante 10 minutos, após esse período serão realizadas lavagens consecutivas com água destilada e a capsula será partida com o auxílio de um bisturi. Os frascos serão flambados antes e depois da inserção de sementes e vedados com plástico filme e posteriormente serão levados pra sala de cultivo no orquidário do colégio, onde semanalmente serão 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 para cada tratamento, sendo avaliadas dez plantas em cada frasco escolhidas aleatoriamente. 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

O presente estudo ainda se encontra em andamento, porém alguns tratamentos já apresentaram germinação, como grevílea *in natura* e pinos *in natura*, que em todas as 5 repetições apresentaram formação de plantulas. Outros tratamentos ainda encontram-se em estagio de germinação, espera-se que estes germinem antes ou simultaneamente como o controle.

Resultados que corroboram com os de Rezende et al, 2008 que afirma que, para explantes de outras espécies, como o café, foi verificado melhor desenvolvimento na ausência ou com baixa concentração de Ágar, devido a maior facilidade de absorção de nutrientes e/ou reguladores de crescimento pelos tecidos vegetais. Assim como Dorta et al. 2006, obteve resultados de que o amido de milho em variantes concentrações de 10 gL⁻¹ a 50 gL⁻¹ podem atuar como um possível substituto ao Ágar.

Deb & Pongener (2010), para o crescimento da espécie *Cymbidium aloifolium*, os quais observaram que a natureza da matriz física proporcionada pela espuma de poliuretano facilitou o crescimento de raízes *in vitro*, fator este que poderia melhorar a absorção de nutrientes do meio de cultura e propiciar maior crescimento com aumento da massa seca. O que pode ser decorrente da espuma de poliuretano ser uma superfície mais sólida ajudando então. Assim, o suporte oferecido pela espuma favorece uma condição na qual os protocormos utilizam, com maior eficiência, os nutrientes do meio de cultura fornecido no estado líquido enquanto o meio semissólido com ágar limita a difusão de nutrientes até o explante (Caldas et al., 1998).

Faria et al. (2006) no intuito de diminuir o custo do meio de cultura realizaram experimentos com o objetivo de substituir o ágar em meios nutritivos para o cultivo de *Oncidium*

baueri Lindley (Orchidaceae) e chegou a conclusão de que tratamentos contendo esfagno ou areia não foram indicados para substituírem o ágar, porém, o tratamento com espuma de poliuretano picada para substituição do Agar se mostrou eficaz na propagação in vitro daquela orquídea.

Gaudêncio (2014), que desenvolveu um projeto utilizando diferentes aditivos alternativos para substituir o Agar no cultivo de *Catasetum schmidtianum* e chegou a conclusão que meio em que foi utilizado a gelatina como agente geleificante apresentou melhor desenvolvimento dos protocormos, podendo este ser estabelecido como protocolo alternativo de geleificação

Conclusões

Os resultados obtidos na primeira parte foram que o extrato de flor de pedra na concentração de 4g l^{-1} foi o mais eficaz, os restantes se mostraram inferiores. Já na segunda parte, nenhum dos tratamentos se mostrou eficaz, sendo assim tem-se necessidade de fazer mais testes.

Referências

ARDITTI, J. & ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. (ed). **Orchid Biology : Reviews and Perspectives**, v. 3. Ithaca: Cornell University Press, 1984. p.179-204.

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 transformação genética de plantas**. v.1. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1998. p.87-132.

DEB, C. R.; PONGENER, A. Search of alternative substratum for agar in plant tissue culture. *Current Science*, v.98, n.1, p.99-102, 2010. . 02 Nov. 2011.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. **Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*** (PE-2 and M-26). *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 177-182, 2006.

FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. **Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar**. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERRI, V.C., NACHITIGALL, G.R. Influência da sacarose e do ágar na cultura in vitro do clone de pereira Decaisne-6. In: **VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HORTICULTURA**, Associação Latinoamericana de Horticultura, Montevideo, p.6, 1996.

FORTES, G.R.de L., CONCEIÇÃO, A.M., ZANOL, G. Uso do amido comercial como meio solidificante para ematamento "in vitro" de morangueiro (*Fragaria x ananassa*). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13, Associação Brasileira de Fruticultura, Salvador. p. 11-14, 1994.

GAUDÊNCIO R. R. L.; MIRANDA D. P.; KARSBURG I. V. 2014, **Germinação in vitro de sementes de catsetum schmidtianum miranda & lacerda em diferentes geleificantes alternativos**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2014

MORAES, C.P., DIOGO, J.A., CANABRAVA, R.I., PEDRO, N., FURTADO, A.L., & MARTELINE, M.A. (2010). Desenvolvimento in vitro de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. *Revista Brasileira de Biociências*, 8.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento in vitro de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 7, p. 67-69, 2009

REZENDE, J. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E CONCENTRAÇÃO DE AGAR NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE CAFÉ ORIUNDAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA *Scientia Agraria*, vol. 9, núm. 1, 2008, pp. 21-26 Universidade Federal do Paraná Paraná, Brasil.

SANTOS, A.F.; VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; GOULART, M.S.; NOVAIS, R.F.; CECON, P.R.; TEIXEIRA, S.L. & MOURA, E. 2006. **Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado**. Horta, 46: 8- 12.

SHEEHAN, M.; SHEEHAN, T. **Ilustred survey of orchidg genera**. New York: Press Syndicate of University of Cambrige, 1994.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. **Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso**. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 7, p. 25-33, 2001.

SUTTLEWORTH, F. S.; HEBERT, S. Z.; GORDON, W. D. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994.

TRUJILLO, G. & HERNÁNDEZ, Y. 1999. **Bacterial spot in orchid**. *Fitopatologia Venezolana*, 12(1): 4-8.

TRUJILLO, G.; HERNÁNDEZ, Y. Bacterial spot in orchid. **Fitopatologia Venezolana**, v.12, p. 4-8, 1999.

VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHOS, S. V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R. & CECON, R.P. 2002. Organogênese in vitro a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, 47(286): 613-628.

VICHIATO, MÍVIA ROSA DE MEDEIROS ET al . Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. **Ciênc. agrotec.**, Lavras , v. 31, n. 1, p. 16-20, fev. 2007 .