

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 2

Campinas, Julho de 1942

N.º 7

PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS POR SEMENTES

Coarací M. Franco

INTRODUÇÃO

O presente trabalho pouco traz de novo. É uma verificação do método assimbiótico de multiplicação das orquídeas por semente, cujo autor é Knudson (4, 5 e 6). Este processo suplantou todos os demais, não somente pelo seu rigor científico como também pelos resultados práticos. Enquanto antes poucas plantas se conseguiam, filhas de uma única, hoje, com esse processo, se obtêm tantas quantas se queiram descendentes de uma única planta.

Nos Estados-Unidos é o método largamente empregado. Na Argentina muitos cultivadores de orquídeas o usam. Entre nós, que saibamos, a primeira pessoa a empregá-lo foi o dr. Paulino Rech, em Amparo, Estado de São Paulo, possuidor de um grande e valiosíssimo orquidário, que assim pode criar grande número de híbridos. O dr. Rech, muito modesto, nada publicou a respeito das suas experiências e observações sobre orquídeas, assunto de que é profundo conhecedor. Hoehne (3), em seu album, descreveu sumariamente o método. Talvez o melhor texto sobre a cultura de orquídeas seja o de White (7), que cuida pormenorizadamente de várias técnicas, inclusive a de Knudson.

Infelizmente, entre nós, a propagação de orquídeas por sementes não tomou até hoje grande incremento, e isto, quem sabe, porque nas nossas matas ainda existe grande número dessas vítimas faceis e indefesas de mercadores gananciosos e sem instrução que, nos mercados, entre cebolas e alhos, vendem espécimes dessas jóias da nossa flora.

BREVE HISTÓRICO

Nas raízes das orquidáceas vivem fungos chamados, de um modo geral, "mycorrhiza". Parecem viver em simbiose com a planta. Penetrando nas raízes, não vão além do cortex. A função deles é ainda obscura. Todavia, parece que favorecem a nutrição da planta e, talvez, por ação de seus enzimas, tornem assimiláveis às orquídeas muitos compostos que de outro modo não seriam aproveitados.

Bernard (1), observando que era prática geral entre os floricultores semear sementes de orquídeas no próprio substrato onde cresciam as plantas mães, achou que deveria existir alguma relação entre a germinação e os "mycorrhiza". Julgou aquele autor que esses fungos se associavam aos embriões das sementes e trabalhou no sentido de esclarecer esta questão. Isolou fungos de vários gêneros de orquidáceas, identificando-os como pertencendo ao gênero *Rhizotonia*. Três "strains" foram isolados: de *Cattleya*, de *Phalonopsis* e de *Odontoglossum*. Com o fim de verificar se o fungo poderia promover a germinação das sementes dessas espécies de orquídeas fez o seguinte: cápsulas foram lavadas em álcool, flambadas e, a seguir, as sementes foram retiradas com cuidado, asepticamente. Como meio de cultura, Bernard usou um extrato aquoso de "salep" — rizomas de uma orquídea do gênero *Ophrys*. Este extrato assim obtido continha amido, pentosanas, traços de proteínas, sais minerais e traços de açúcares. Com estas experiências ele pode fazer as seguintes e interessantes observações: quando sementes acépticas de *Cattleya* eram semeadas nesse meio, elas cresciam até cerca de 0,5 mm e, então, o seu desenvolvimento paralisava. A germinação prosseguia quando o fungo isolado de *Cattleya* era posto junto às sementes. Notou também especificidade de fungo em relação à planta da qual ele fora isolado. Assim, o fungo de *Odontoglossum* só agia em *Odontoglossum*, e não em espécies de outros gêneros. Bernard explicou dizendo que o fungo digeriu o amido do embrião. O açúcar formado elevava a pressão osmótica, o que atuava como estímulo à germinação.

Burgeff (2), estudando também o assunto e usando solução nutritiva com amido, observou que não havia germinação sem "mycorrhiza". Também atribuiu a germinação à formação de açúcar.

Knudson (6), partindo da hipótese de que a ação do fungo sobre o meio de cultura poderia favorecer a germinação, ao invés de uma ação direta dele sobre o embrião, semeou sementes de orquídeas sobre um meio de cultura constituído de agar e solução nutritiva. A germinação

apenas se iniciava, mas logo se tornava estacionária, apesar de serem todos os fatores a ela favoráveis. Juntando açúcar ao meio de cultura, o desenvolvimento se dava a ponto de obter "seedlings" após 3 meses de sementeira. Tomou, então, aquele autor uma série de balões com solução nutritiva, agar e amido, e, em alguns deles, plantou o fungo. Nestes últimos a germinação se deu, enquanto nos primeiros não se processou. Isto indicava que o fungo digeriu o amido, e que o embrião utilizava os açúcares então formados para a sua nutrição.

Para melhor isto provar, Knudson fez o seguinte: tomou frascos com meio de cultura, fez o plantio do fungo, deixando-o que se desenvolvesse até certo ponto, quando então o matou por esterilização. As sementes semeadas neste meio germinaram, ao passo que as semeadas em frascos com o mesmo meio de cultura e tratadas do mesmo modo, porém, sem o fungo, não germinaram.

Analisando o meio, constatou que o fungo, de-fato, havia digerido a matéria orgânica e, assim, fornecido ao embrião açúcares assimiláveis. Ficou assim provado que o papel do fungo era o de desdobrar o amido do meio de cultura em açúcares, e que, havendo matéria orgânica diretamente assimilável pelo embrião, a presença do fungo é desnecessária.

Knudson conseguiu o florescimento de orquídeas em meio assimbiótico, 6 anos após a sementeira.

Na natureza, naturalmente, o papel do fungo é semelhante, isto é, desdobra a matéria orgânica do substrato cujos produtos solúveis e assimiláveis são aproveitados pelo embrião.

AS SEMENTES

As sementes das orquídeas são muito pequenas; tão pequenas que uma só cápsula, de *Cattleya*, por exemplo, pode conter mais de meio milhão delas. Devido a esse pequeno tamanho, assemelham-se a um pó muito fino, no interior do fruto. O embrião no interior de um tegumento transparente é de tipo indiferenciado, porém as células da região basal são maiores do que as da apical. Na base encontra-se um delicado suspensor.

A dificuldade da germinação das sementes de orquídeas pelos métodos usuais é devida não somente ao seu reduzido tamanho, mas, principalmente, ao fato de trazerem reservas nutritivas em quantidades insignificantes.

O poder germinativo das sementes, quando guardadas em ambiente comum, não se conserva por muito mais de um ano. Com a seguinte

técnica, porem, o poder germinativo pode ser preservado por vários anos: Colhida a cápsula antes de sua deiscência na planta, é posta em envelope, onde deve ficar até que se abra e a maior parte das sementes saiam do fruto. Então, retiram-se as que restarem no interior da cápsula, deixando-as secar ao ar, por vários dias, embrulhadas em papel de filtro ou em outro papel sem goma e bem permeavel. Depois disto, as sementes são colocadas em um pequeno tubo de vidro, fechado com tampão de algodão. Este tubo é então colocado em um dissecador com cloreto de cálcio anhidro, que deve ser conservado dentro de um refrigerador a cerca de 10°C.

Deve-se evitar, tanto quanto possivel, que as sementes fiquem expostas ao ar sem que estejam em um envelope ou sob outra qualquer proteção. Assim se procede para que não acumulem poeira ou esporos de fungos, que, mais tarde, poderão prejudicar o trabalho.

O fruto, logo depois de colhido, deve tambem ser limpo por fora ; há mesmo quem o flambe.

MEIO PARA A GERMINAÇÃO

Empregamos o mesmo meio descrito por Knudson, já citado, e que consta do seguinte :

Ca (NO ₃) ₂	1,0 gr
K ₂ HPO ₄	0,25 "
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25 "
FePO ₄	0,05 "
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 "
Sacarose	20,0 "
Agar	15,0 "
H ₂ O	1000 cc.

Este meio é aquecido até completa fusão do agar e após certo resfriamento ; porem, antes de se solidificar, acerta-se o pH para um valor entre 4,4 — 5,0. Para isto, emprega-se uma solução diluida de ácido sulfúrico ou clorídrico, que é adicionada aos poucos. Isto feito, distribue-se o meio em frascos de Erlemeyer ou outro que se preste bem de modo a ficar, em cada um, uma camada de 1,5 a 2,0 cm de meio nutritivo. Estes frascos são então tapados com algodão e aquecidos duas vezes a 100°C., durante 15 minutos, com intervalo de 24 horas. Após o resfriamento, estão prontos para ser usados.

Esse processo pareceu-nos melhor que o da esterilização a 120°C., porque, estando o pH do meio próximo a 4,5, o agar é hidrolizado quando aquecido a 120°C. e não mais se solidifica.

Ao lado dos balões Erlemeyer, preparamos tubos de cultura de 22 x 3,5 cm contendo o mesmo meio. Nesses tubos, os embriões se apresentavam bastante cloróticos e as plantinhas não se desenvolviam bem. Determinamos então o pH do meio nos Erlemeyers e nos tubos, antes e depois de esterilizados.

Eis os resultados :

	pH antes da esterilização	pH depois da esterilização	Diferença
Erlemeyer de vidro "Jena"	4,66	4,58	— 0,08
Erlemeyer de vidro "Jena"	4,66	4,61	— 0,05
Tubos de vidro ordinário	4,66	6,53	+ 1,87
Tubos de vidro ordinário	4,66	5,97	+ 1,31

O vidro desprendia, pois, bases durante a esterilização e assim elevava demasiadamente o pH. A análise espectrográfica do vidro de que eram feitos os tubos revelou o seguinte(*) : grande quantidade de sódio, silício e magnésio ; quantidade regular de cálcio, alumínio, boro e chumbo ; traços acentuados de manganês e traços de cobre, bário, ferro, estanho, titânio e arsênio. É possível que traços dos elementos altamente tóxicos contidos no vidro se desprendessem no meio de cultura e também prejudicassem as plantinhas.

SEMEACÃO OU PLANTIO

Para a esterilização das sementes, usamos o método de Wilson (8), do hipoclorito, já usado também por Knudson, aliás, o único talvez que tem sido empregado com sucesso para esse fim. Consta este método do seguinte : 10 gr de hipoclorito de cálcio são misturadas com 140 cc

(*) Esta análise devemos à gentileza do dr. O. Bergstrom Lourenço, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo.

de água; agita-se por alguns momentos e filtra-se. Este filtrado é um líquido, rico em cloro, com o qual as sementes devem ser tratadas. Estas são postas em um tubo de ensaio que deverá conter até 3/4 da sua capacidade com aquele líquido filtrado. Fecha-se o tubo muito bem com uma rolha de borracha e agita-se. Após 15 minutos de agitação, pode-se começar a sementeação nos frascos. Não é preciso apressar o trabalho, uma vez que a permanência das sementes na solução esterilizante, mesmo de várias horas, não causa mal.

A sementeação é feita, de preferência, dentro de uma câmara acéptica, construída de vidro, onde somente os braços do operador têm ingresso por meio de duas pequenas aberturas tendo cada uma delas uma cortina de pano em sua frente. Estas cortinas, bem como toda a câmara internamente, devem estar muito bem molhadas com uma solução de sublimado corrosivo a 1 ‰ antes do início do trabalho. A câmara aqui descrita é a que possuímos e que se tem mostrado muito eficaz.

Com o auxílio de uma alça de platina, as sementes são tiradas do tubo e espalhadas à superfície do meio nutritivo. Esse fio é flambado cada vez de ser usado. A quantidade de sementes aderidas de uma só vez à volta do fio de platina ou, quando muito, duas porções destas, são suficientes para cada frasco. Quando são levadas sementes em excesso a um mesmo frasco, as plantinhas se desenvolvem mal e o seu transplante é muito dificultado.

Os frascos, após o plantio, recebem, protegendo o tampão de algodão, um pequeno tubo de vidro, de tamanho adequado, invertido sobre o seu gargalo. Isto é necessário para se evitar o acúmulo de poeira no algodão e para prevenir contaminação.

As contaminações, quando tardias, nem sempre matam as plantinhas. Foi-nos possível aproveitar as plantinhas de vários frascos contaminados.

O desenvolvimento do embrião e, posteriormente, das plantinhas varia bastante com o gênero, com o ambiente e, principalmente, com a temperatura.

Algumas semanas após, o embrião se torna esférico, verde, devido à formação de clorofila, e visível a olho nu. Da epiderme crescem pelos absorventes. Mais tarde veem-se formar as primeiras folhas e a raiz primária.

Quando a raiz atinge 3 a 5 mm as plantinhas devem ser transplantadas. Para *Cattleya* isto se verifica 4 a 6 meses após a sementeação.

TRANSPLANTE DOS BALÕES PARA VASOS

Esta é a operação mais crítica para a vida das mudinhas. Ambientadas ao meio todo especial dos balões, com atmosfera saturada e sem nenhuma corrente de ar, etc., passando a viver em vaso, em substrato e ambiente bem diverso daquele, as mudinhas reagem, por vezes, mal.

Usamos para o transplante, vasilhos de barro, de forma cônica, com cerca de 8 cm de diâmetro na boca por 8 cm de profundidade. O tamanho dos vasos, entretanto, não importa. Pode ser outro. Estes vasos se enchem do seguinte modo: no fundo, vão pequenos cascalhos; sobre estes, uma camada de *sphagnum* grosseiro tomando a maior parte do vaso, de modo a faltar apenas 1 cm para o seu completo enchimento. Finalmente, vai uma camada de *sphagnum* muito bem moído(*).

Tanto a primeira como a segunda camada de *sphagnum* devem sofrer ligeira compressão. O *sphagnum* deve ser molhado antes de ser colocado nos vasos, pois, do contrário, a primeira rega será difícil e imperfeita.

As plantinhas são retiradas dos balões por meio de um pedaço de arame de grossura adequada, tendo uma alça na extremidade. Fisga-se uma plantinha de cada vez, e esta deve ser lavada em água para se eliminar o agar aderido. Sobre o *sphagnum* no vaso, faz-se um pequeno orifício com o arame, colocando-se nele a raiz da plantinha. Chega-se bem o *sphagnum* ao seu redor.

Nos vasos, cujas dimensões foram dadas acima, colocam-se mais ou menos 50 plantinhas. Toca, assim, aproximadamente, 1 cm² para cada uma. Os vasilhos são a seguir cobertos com um cristalizador de vidro. Com o auxílio de calços de madeira, a-fim-de que as plantinhas, paulatinamente, se adaptem ao ambiente da estufa, levantam-se, aos poucos, os cristalizadores. Ao cabo de 30 dias, as plantinhas estarão em ambiente igual ao da estufa.

TRANSPLANTES SUCESSIVOS E TRATOS

Nos vasilhos, as plantas permanecem até que o seu desenvolvimento possa ser comprometido pela falta de espaço. No nosso caso, trabalhando com *Cattleya*, elas permaneceram pouco mais de 6 meses.

Então, foram transplantadas para outros vasos maiores, apropriados para orquídeas, largos, rasos e com orifícios nos lados. As figuras

(*) O operário que executava este serviço preferia moer o *sphagnum* entre as mãos. Estando bem seco, pode ser reduzido a pó com extrema facilidade. Um *sphagnum* bem moído, facilita o transplante.

n.ºs 1 e 2 mostram um desses vasos com as plantas. Aos 2 anos, foram transplantadas para vasos idênticos, contendo 3 plantinhas cada um. Estes vasos foram enchidos com pedaços de xaxim tendo uma camada de *sphagnum* na superfície.

Quanto aos tratos culturais, são pequenos. As regas, logo após o primeiro transplante, devem ser frequentes, para se conservar o substrato e o ambiente bem úmidos.

Deve-se, aos poucos, rarear as regas até que estejam as plantas bem adaptadas aos vasos, quando se farão regas abundantes, seguidas de um período suficientemente longo para que o substrato se torne seco. Regas contínuas prejudicam muito as raízes pela falta de arejamento. Também favorecem o desenvolvimento de larvas de certas moscas, que causam prejuízos enormes, roendo as plantinhas. A água das regas deve ser a de chuva. Na falta desta, a dos rios, córregos ou nascentes. Nunca se deve empregar a água do abastecimento das cidades, muito embora não seja clorada. A água por nós usada foi a de chuva, captada em um reservatório especial.

SUMMARY

Knudson's asymbiotic method and medium for germination of orchid seeds were used with success.

Heating this medium at 100°C twice for 15 minutes with an interval of 24 hours was found to be better than to sterilize just once at 120°C. This procedure avoids the hydrolysis of the agar.

The poor quality of the glass from which some test tubes were made raised the pH above 5.9 and this was apparently the cause of poor developmen of the seedlings.

Also some toxic elements given off by the glass diffusing thru the medium might have impaired somewhat the results obtained in the experiment.

LITERATURA CITADA

1. **Bernard, N.** L'évolution dans la symbiose. L'Orchidées et leur champignons commensaux. Ann. Sci. Nat. Bot. 9:1-96, 1909.
2. **Burgeff, H.** Em Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze, Jena, 1909.
3. **Hoehne, F. C.** Em Album de Orquidáceas Brasileiras e o Orquidário do Estado de São Paulo. Publ. Secr. Agr. Estado de São Paulo, pág. 1-264, il., 1930.
4. **Knudson, L.** Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73:1-25, 1922.
5. **Knudson, L.** Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botl. Gaz. 77:212-219, 1924.
6. **Knudson, L.** Physiological study of the symbiotic germination o orchid seed's. Bot. Gaz. 79:345-379, 1925.
7. **Knudson, L.** Flower production by orchid grown non-symbiotically, Bot. Gaz. 89:192-299; Ilustr. 1930.
8. **White, E. A.** Em American Orchid Culture. 2.ª edição, pág. 1-256, il., New York, De La Mare Co., 1939.
9. **Wilson, J. K.** Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. Amer. Jour. Bot. 2:420-427, 1915.



Fig. 1

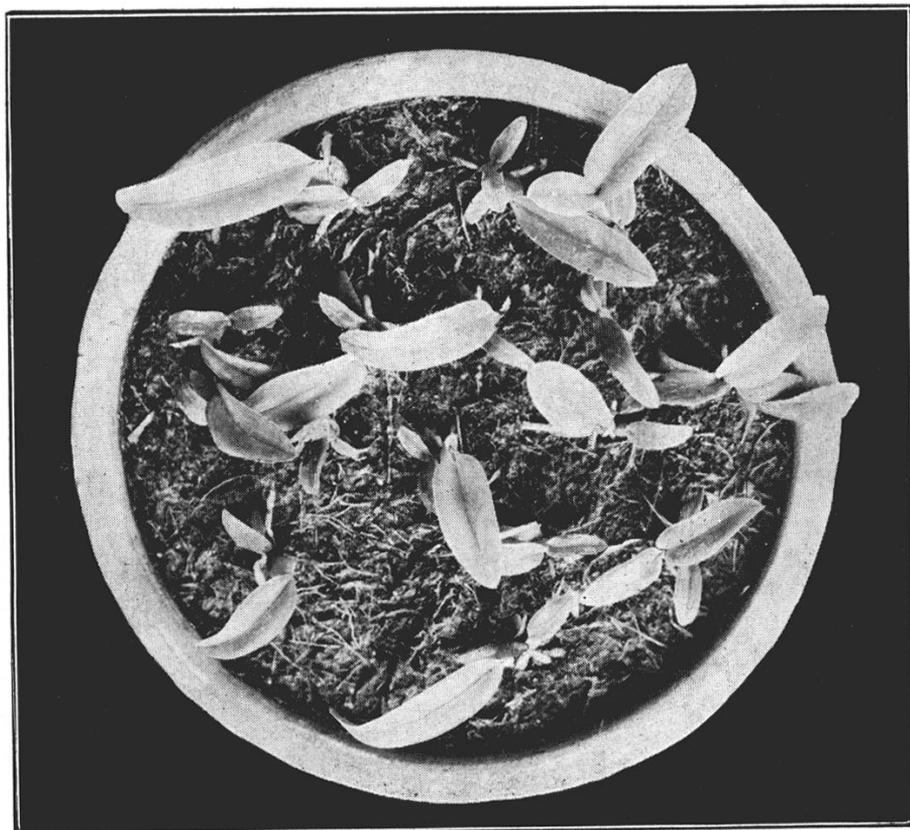


Fig. 2