

Produção de Orquídeas em Laboratório





Ricardo Tadeu de Faria
Adriane Marinho de Assis
Lilian Keiko Unemoto
Jane Fiuza Rodrigues Portela de Carvalho

Produção de Orquídeas em Laboratório

Editora Mecenass Ltda
Londrina – Paraná – Brasil
2012

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte deste livro pode ser reproduzida ou transmitida de qualquer forma ou por quaisquer meios eletrônico, mecânico, fotocopiado, gravado ou outro sem autorização prévia por escrito da Editora Mecenass Ltda.

Revisão técnica

Deonissio Destro

Revisão ortográfica

Edina Regina Pugas Panichi

Miguel Luiz Contani

Capa, Projeto gráfico e Editoração eletrônica

Kely Moreira Cesário

Foto da capa: *Hadrolaelia purpurata*

Foto da contracapa: Sementes de orquídea em microscópio

Impressão e Acabamento

Midiograf

Catálogo na publicação elaborada pela Bibliotecária
Neide Maria Jardinette Zaninelli / CRB-9/884.

Dados Internacionais de Catálogo-na-Publicação (CIP)

P964 Produção de orquídeas em laboratório/ Ricardo Tadeu de
Faria... [et al.] – Londrina: Mecenass, 2012.
124 p.

Vários autores.
ISBN 978-85-89687-10-2

1. Orquídea – Cultivo. 2. Orquídea – Produção.
3. Orquídea – Cultivo em laboratório. I. Faria, Ricardo Tadeu
de.

CDU 635.9

Copyright © 2012

Direitos desta obra reservados à EDITORA MECENASS LTDA.

Rua Piauí, 191 - Loja 58

CEP 86.010-420, Londrina, PR, Brasil

E-mail: editoramecenass@yahoo.com.br

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Agradecimentos



Agradecemos a Deus, fonte de amor, coragem e esperança.

Aos nossos familiares e amigos, que foram imprescindíveis para a realização desta obra.

Ao amigo Dr. Deonísio Destro, pela parceria profissional, motivação e preciosa assessoria na conclusão desta obra.

À amiga Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi, professora de Produção e Tecnologia de Sementes da UEL, pelo incentivo, companheirismo e acompanhamento nas pesquisas realizadas.

Ao amigo Geraldo Lopes da Silva, técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos da UEL, pelo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da UEL, José Vicentini Neto, Alessandro Borini Lone e Fernando Okamura, pela contribuição.

Ao Chefe do Departamento de Agronomia da UEL, professor Dr. Sérgio Ruffo Roberto e aos professores do Curso de Agronomia da UEL, pela amizade e dedicação ao ensino.

À UEL, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), instituições de suma importância ao desenvolvimento das atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Ao Sr. João Batista Teixeira (Embrapa Recursos Genéticos) pela
colaboração com a imagem do biorreator.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para
tornar esta obra realidade.

Os autores

Sumário



Apresentação	1
--------------------	---

Capítulo 1

Introdução

Por que produzir orquídeas <i>in vitro</i>	3
--	---

Capítulo 2

Infraestrutura e Principais Equipamentos de um Laboratório

I. Introdução	7
II. Infraestrutura e principais equipamentos.....	7
A. Sala de preparo dos meios de cultura	8
B. Sala de transferência.....	11
C. Sala de crescimento.....	14
D. Sala de lavagem e esterilização.....	16
E. Vidrarias e outros utensílios	18
F. Outras instalações	24

Capítulo 3

Meios de Cultura

I. Introdução	27
II. Composição dos meios de cultura	28
III. Uso de reguladores de crescimento	30
Preparo de soluções de reguladores.....	31
IV. Consistência do meio de cultura	31
V. Ajuste de pH.....	33

VI. Principais meios de cultura	33
A. Meio Murashige & Skoog (1962).....	33
B. Meio Knudson C (1946) e meio Vacin & Went (1949).....	39
C. Meio de cultura para laboratórios caseiros.....	41
VII. Esterilização e manutenção das condições assépticas	42
Capítulo 4	
Polinização e Obtenção de Sementes	
I. Introdução	47
II. Estrutura da flor de orquídea.....	47
III. Época de florescimento	49
IV. Cápsula e sementes	51
V. Polinização controlada.....	53
VI. Regras para dar nomes às orquídeas	59
Capítulo 5	
Propagação <i>in vitro</i> de Orquídeas por Sementes	
I. A semente de orquídea e sua germinação	63
II. Semeadura a partir de cápsulas de sementes fechadas	67
III. Semeadura a partir de cápsulas de sementes abertas	70
IV. Repicagem de plantas	73
Capítulo 6	
Clonagem de Orquídeas	
I. Introdução	79
II. Escolha da planta-matriz e coleta do broto	81
III. Estabelecimento da cultura	84
IV. Fase de multiplicação e enraizamento.....	88
V. Biorreatores na micropropagação de orquídeas	91
Capítulo 7	
Aclimatização	95
Capítulo 8	
Considerações Finais sobre a Produção Comercial de Orquídeas	103
Glossário	107
Referências	113

Apresentação



As orquídeas são plantas ornamentais que se destacam na floricultura e encantam os consumidores pela beleza, exotismo, diversidade de cores, tamanhos e formas, além de algumas espécies serem fornecedoras de aromas e outros componentes utilizados na indústria.

A produção de orquídeas vem sendo constantemente aprimorada e, entre os métodos de multiplicação de plantas, a propagação *in vitro* possibilita a obtenção de mudas com excelente padrão e qualidade, aptas a atenderem a demanda do mercado.

Vários estudos sobre a produção *in vitro* de orquídeas foram desenvolvidos com a colaboração de professores, pesquisadores, alunos e técnicos. Assim, as experiências obtidas em 15 anos de trabalho no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual de Londrina-PR nos motivaram a partilhar as informações sobre a produção de orquídeas em laboratório com produtores, colecionadores e demais apreciadores.

Foram reunidas, neste trabalho, informações sobre a multiplicação de orquídeas em laboratório, desde a infraestrutura até o preparo de meios de cultura, polinização para a obtenção de sementes,

procedimentos de semeadura, subcultivos e clonagem de orquídeas. Também disponibilizamos informações sobre a aclimatização das mudas, de modo a facilitar a compreensão do leitor e demonstrar a viabilidade da produção de orquídeas em laboratório.

Os autores

Capítulo 1

Introdução

Por que produzir orquídeas *in vitro*



As orquídeas pertencem a uma das maiores e mais interessantes famílias de plantas, principalmente quando consideramos a imensa variação de cores, as curiosas formas e os diversos tamanhos. Existem no mundo, aproximadamente, 35.000 espécies e 800 gêneros, sendo que as características anteriormente mencionadas potencializam o seu valor no mercado de plantas ornamentais.

No Brasil, já foram catalogados cerca de 200 gêneros e 2.300 espécies de orquídeas, sendo os principais gêneros: *Acacallis*, *Aspasia*, *Batemannia*, *Bifrenaria*, *Brassavola*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Cirrhaea*, *Comparettia*, *Coryanthes*, *Cycnoches*, *Cyrtopodium*, *Epidendrum*, *Galeandra*, *Gomesa*, *Gongora*, *Grobya*, *Ionopsis*, *Laelia*, *Lepanthopsis*, *Leptotes*, *Lockartia*, *Masdevallia*, *Maxilaria*, *Miltonia*, *Mormodes*, *Octomeria*, *Oncidium*, *Ornithocephalus*, *Pleurothallis*, *Polystachia*, *Promenaea*, *Rodriguezia*, *Schomburgkia*, *Sobralia*, *Sophronitis*, *Stanhopea*, *Stelis*, *Trichocentrum*, *Vanilla*, *Xylobium* e *Zygopetalum* (Silva, 1986).

Essa diversidade de gêneros e espécies faz com que as orquídeas sejam muito apreciadas como planta de vaso, flor de corte ou no paisagismo. Também apresentam um importante papel como

componente florístico de diversos ecossistemas; na produção de vanilina, que é extraída de espécies do gênero *Vanilla* e na obtenção de alcalóides, utilizados na farmacologia. Além disso, mesmo as espécies de tamanho reduzido têm valor botânico para colecionadores e admiradores.

Independente do gênero, as orquídeas podem ser multiplicadas de maneiras distintas. Para suprir as necessidades de produção, as técnicas de cultivo *in vitro* são imprescindíveis para acelerar e otimizar o processo produtivo. O termo *in vitro* vem do latim e significa “em vidro”. É utilizado para denominar processos biológicos que ocorrem em condições artificiais, como as de um laboratório, que possui fatores, como temperatura e luminosidade controladas. As plantas cultivadas nas condições *in vitro* se desenvolvem em recipientes de vidro ou plástico, contendo um meio de cultura que disponibiliza água e nutrientes para seu crescimento (Figuras 1.1 e 1.2).

Por muitos anos acreditou-se que as sementes das orquídeas não eram capazes de germinar, pois apesar da quantidade e da facilidade de dispersão, poucas sementes germinam na natureza, por serem constituídas basicamente pelo embrião, não possuindo substâncias nutritivas de reserva necessárias para iniciar a germinação.



Figura 1.1. Orquídeas propagadas *in vitro*.



Figura 1.2. Detalhe das plântulas *in vitro*.

O cultivo *in vitro* de orquídeas é amplamente difundido entre os laboratórios de cultura de tecidos e uma das principais vantagens desta técnica é a produção de plantas em quantidade, aliada à qualidade das mudas. Além disso, possibilita a obtenção de praticamente 100% de sementes germinadas e, por meio da micropropagação de matrizes selecionadas, é possível a produção de plantas livres de doenças, com a garantia de preservar as mesmas características da planta-matriz.

Outro importante fator é o apelo ecológico, ao considerar que muitas espécies de orquídeas estão em risco de extinção. Nesse caso, o cultivo *in vitro* torna-se um importante instrumento de preservação, pois permite a multiplicação de espécies para fins comerciais, juntamente com a independência do produtor em relação às plantas silvestres, reduzindo a extração na natureza.

Dessa forma, as técnicas de cultivo *in vitro* de orquídeas suprem satisfatoriamente a demanda do mercado, e também contribuem com a preservação do meio ambiente, sendo, portanto, uma importante ferramenta a ser utilizada na produção de mudas. O cruzamento entre plantas por meio da polinização, seja em sua forma natural ou induzida pelo homem, tem feito com que os produtores e colecionadores busquem novas variações de orquídeas, acirrando a competitividade no mercado.

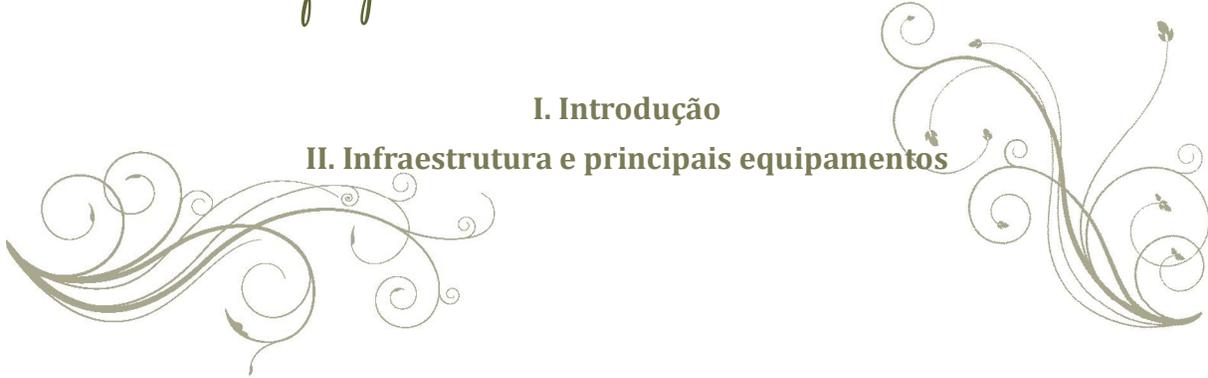


Capítulo 2

Infraestrutura e Principais Equipamentos de um Laboratório

I. Introdução

II. Infraestrutura e principais equipamentos



I. Introdução

O laboratório para produção de orquídeas deve ser projetado de acordo com o volume de produção desejado. Independente da quantidade de plantas a ser produzida no laboratório, este deve ser estruturado de modo a facilitar os procedimentos de rotina, o deslocamento de pessoas e dos materiais, atentando-se principalmente aos cuidados com as condições assépticas do local, visando evitar a ocorrência de contaminação por fungos e bactérias, que está diretamente relacionada com a qualidade da produção.

II. Infraestrutura e principais equipamentos

Em geral, um laboratório é dividido em: **sala de preparo dos meios de cultura, sala de transferência, sala de crescimento e sala de lavagem e esterilização**. Cada uma destas salas deve ser organizada e equipada de acordo com as atividades a serem realizadas. A Figura

2.1 apresenta um modelo de distribuição das principais áreas de um laboratório de micropropagação; contudo, pode variar de acordo com o espaço disponível e o volume de produção.

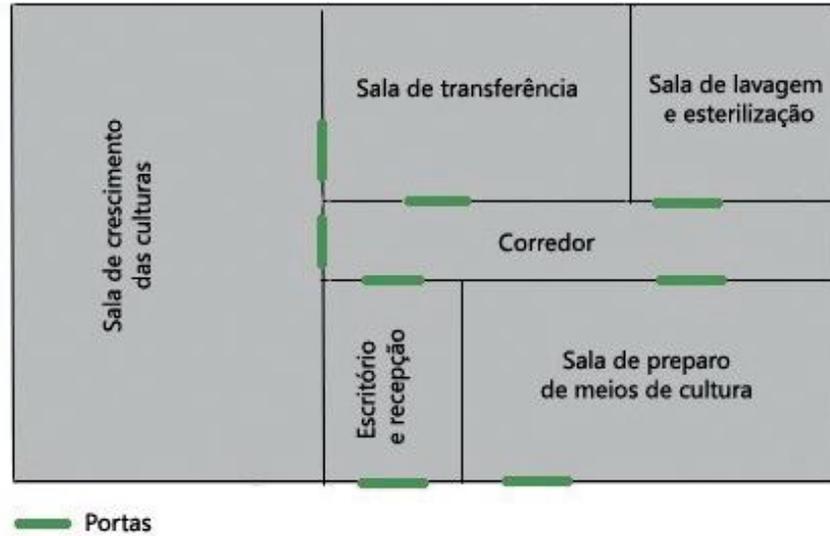


Figura 2.1. Principais ambientes de uma unidade de propagação *in vitro*.

A. Sala de preparo dos meios de cultura

Nesta sala são preparados os meios de cultura e as soluções-estoque. Para facilitar o trabalho, esta sala deve possuir bancadas ou mesas, assim como pia e espaço suficiente para a circulação de pessoas e materiais. Deve ser dotada de armários para guardar os reagentes, vidrarias, frascos de cultivo e demais utensílios utilizados no preparo dos meios de cultura.

Equipamentos como peagâmetro, balança e agitador magnético devem estar dispostos sobre as bancadas e, juntamente com o destilador, localizados próximos a tomadas de 110 e 220 volts. Um refrigerador e um freezer são necessários para o armazenamento de soluções-estoque dos meios de cultura, bem como os demais reagentes.

Principais equipamentos da sala de preparo

1. Peagâmetro: Instrumento utilizado para determinação e ajuste de pH do meio de cultura (Figura 2.2).



Figura 2.2. Peagâmetro: medidor de pH.

2. Balança semi-analítica: É fundamental na pesagem de reagentes utilizados em maior quantidade (Figura 2.3).

3. Balança analítica: Utilizada na pesagem de pequenas quantidades de reagentes como os reguladores vegetais. Possui precisão de até quatro casas decimais (Figura 2.4).



Figura 2.3. Balança semi-analítica.

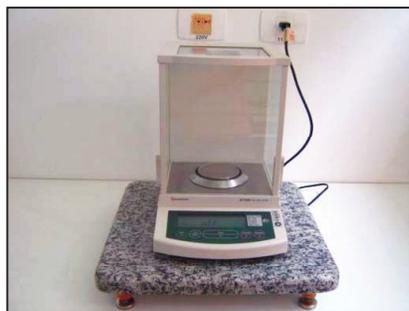


Figura 2.4. Balança analítica.

4. Agitador magnético: Instrumento que auxilia na dissolução de reagentes (Figura 2.5) em conjunto com a barra magnética (Figura 2.6).

O béquer contendo a solução que se pretende homogeneizar é colocado sobre a placa do agitador e a barra magnética é inserida

dentro do béquer com a solução, onde é criado um campo magnético que garante a agitação da solução.

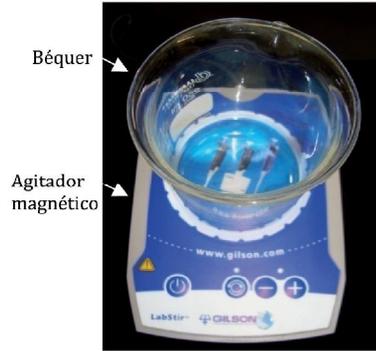


Figura 2.5. Agitador magnético utilizado na homogeneização de de soluções.

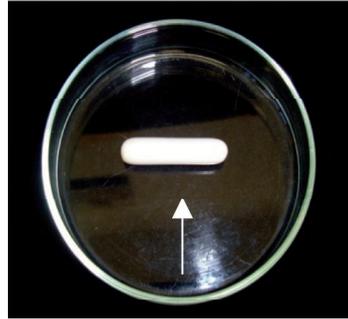


Figura 2.6. Barra magnética.

5. Destilador: É utilizado na eliminação de sais minerais da água. Muitas vezes é conectado à fonte de água e ao deionizador (Figura 2.7).



Figura 2.7. Destilador e recipiente para armazenar água.

6. Deionizador: Também tem a finalidade de eliminar os sais minerais da água.