

ASPECTOS DA GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE ORQUÍDEAS

A SEMENTE

A estrutura e o reduzido tamanho das sementes de orquídeas estão entre as mais surpreendentes características da família Orchidaceae. A semente é diminuta, pesando entre 0,3 a 14 g (BURGEFF, 1936 apud ARDITTI, 1967; HARLEY, 1951 apud ARDITTI, 1967), e suas dimensões estão entre 0,25 e 1,2mm de comprimento por 0,09 a 0,27 mm de largura. São produzidas em grande número, na faixa de 1.300 a 4.000.000 de sementes por fruto (TOURNAY, 1952 apud ARDITTI, 1967; ARDITTI, 1964a).

A semente de orquídea consiste de um embrião pequeno e esférico, relativamente indiferenciado, suspenso dentro de uma testa frequentemente transparente e membranosa (WERBLIN, 1963). Na grande maioria das espécies a semente não possui endosperma e o embrião não possui cotilédone. O embrião está unido à testa por uma estrutura denominada suspensor e consiste de células relativamente indiferenciadas, principalmente células isodiamétricas. Nele, duas regiões são distintas, a região posterior formada por células grandes e muitas vezes vacuoladas e, na região anterior ocorrem células menores e pouco vacuoladas. O suspensor constitui-se de células alongadas e provavelmente mortas, podendo ser visto unido à parte posterior do embrião. Enquanto o embrião geralmente possui a forma esférica ou globular, a testa pode variar bastante, desde a forma elíptica, fusiforme, até globular ou arredondada; pode ser muito maior que o embrião ou ter quase as mesmas dimensões (ARDITTI, 1967).

Giulio Cesare Stancato^(*)

É importante salientar que, *in situ*, a formação e o estabelecimento de uma plântula de orquídea ocorre somente se após a germinação da semente, a mesma for infectada por hifas de um fungo simbiote (ARDITTI e ERNST, 1974). A partir desse momento, uma relação "simbiótica" se estabelece e o fungo passa a nutrir a plântula. O estágio de desenvolvimento da semente no qual ocorre a infecção é chamado de protocorme, e a especificidade entre os simbiontes não é restrita, apesar de existirem poucas informações na literatura, principalmente em se tratando de gêneros de orquídeas brasileiras.

MULTIPLICAÇÃO DE ORQUÍDEAS *IN VITRO*

A obtenção de orquídeas a partir de sementes é atualmente um processo rotineiro, com muitas espécies tendo sido literalmente salvas da extinção por este meio. Usando culturas assimbióticas embasadas em técnicas desenvolvidas inicialmente por KNUDSON (1930), milhares de espécimes podem ser produzidos a partir de um único fruto, denominado cápsula. Este é o método mais eficiente e efetivo de se reproduzir plantas de orquídeas.

A semeadura *in vitro* pode ser realizada com as sementes em dois estádios de maturação. No primeiro, espera-se a cápsula secar naturalmente e se abrir, liberando assim as sementes; neste momento as sementes são chamadas de maduras. No segundo, a cápsula é colhida ainda verde, antes da deiscência natu-

ral. Esse processo é conhecido como cultura de cápsula imatura ou verde e é baseado no fato de que sementes nesse estágio de desenvolvimento germinam e produzem plântulas sob cultivo *in vitro*, desde que a cápsula tenha ultrapassado dois terços do tempo entre a polinização e a abertura natural (STANCATO, dados não publicados). KNUDSON (1922) promoveu a germinação de sementes de orquídeas assimbioticamente em meio de cultura contendo sais inorgânicos e sacarose. Presentemente, quantidades de sementes são facilmente germinadas assimbioticamente, no entanto, os conhecimentos sobre seus requerimentos exatos são ainda limitados.

Vários meios nutritivos são propostos para a germinação e crescimento de plântulas de orquídeas. O meio de cultura mais utilizado é o conhecido como KNUDSON "C" (1946a), cuja composição é (g/l): Nitrato de Cálcio 1,00g, Fosfato Monobásico de Potássio 0,25g, Sulfato de Magnésio 0,25g, Sulfato de Amônio 0,50g, Sulfato Ferroso 0,025g, Sulfato de Manganês 0,0075g, Sacarose 20,0g e Agar 8,0g.

ECOFISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO

O processo germinativo em orquídeas assemelha-se mais ao desenvolvimento de uma gema dormente do que à germinação de uma semente propriamente dita. Clorofila pode ou não ser formada após o intumescimento inicial do embrião. O embrião intumescido rompe a testa, adquirindo uma forma esférica ou cônica; esse estágio é conhecido por protocorme. Na região superior o primeiro primórdio foliar torna-se evidente e, em seguida, pêlos absorventes surgem ao redor da região inferior do protocorme, sendo que o mesmo aumenta em diâmetro. Posteriormente, as primeiras folhas aparecem, seguidas pelo surgimento da primeira raiz, resultando no

desenvolvimento de uma planta em miniatura. A sequência de eventos descrita ocorre na maioria das orquídeas com pequenas modificações (KNUDSON, 1922).

Como critério adotado em estudos sobre germinação de sementes de orquídeas, *in vitro*, o início da germinação ocorre quando protocormes verdes ou brancos são observados.

A água é o fator de maior importância na germinação de sementes. Como consequência da estrutura especializada do embrião e da testa nas sementes de orquídeas, estas não são facilmente hidratáveis. A maioria das sementes de Orchidaceae tornar-se-á totalmente hidratada após prolongado período de embebição, ou reduzindo-se esse tempo através de processos físicos que acelerem a absorção de água pelas sementes.

Poucos trabalhos direcionados aos efeitos da temperatura na germinação de sementes de orquídeas foram conduzidos. Isso pode ser devido à faixa relativamente ampla de temperatura, de 6 a 40 °C, na qual essas sementes germinam (ARDITTI, 1967). Porém o intervalo de temperatura mais utilizado experimentalmente para orquídeas epífitas e litofíticas, está entre 20 - 25 °C.

Para espécies terrestres de climas temperados ou boreais, a deiscência do fruto determina o primeiro momento a partir do qual a germinação pode iniciar-se; este controle temporal está ajustado ao potencial máximo de germinação das sementes. As cápsulas que permanecem fechadas durante o período de dormência da planta, são submetidas às baixas temperaturas por períodos prolongados, e isso pode satisfazer os requerimentos por baixas temperaturas para germinação, se tais requerimentos forem necessários. HARVAIS & HADLEY (1967b), estabeleceram que sementes de diversas espécies terrestres européias germinam melhor a 23 °C ou mais, sugerindo que sementes destas espécies não germinam até a próxima estação de crescimento. Ao contrário, segundo determinado

anteriormente por WITHNER (1953), sementes de cápsulas imaturas da espécie de clima temperado *Cypripedium acaule*, germinam mais prontamente do que sementes de cápsulas maduras (deiscentes).

Sementes de orquídeas epífitas e litofíticas variam consideravelmente seus requerimentos de luz para germinar. No entanto, é comum o emprego de baixa intensidade luminosa e a utilização em tempo parcial da luz solar difusa. Em experimentos conduzidos com o gênero *Laelia* e outros afins, ficou evidente que, em fotoperíodos de 16 horas suplementando com lâmpadas do tipo "gro-lux", a germinação, o crescimento inicial e posterior do protocorme são acelerados. Também pode ser utilizada a iluminação contínua com lâmpadas fluorescentes a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

O embrião em sementes de orquídeas, na fase de deiscência da cápsula, é indiferenciado e denominado imaturo. Para as Angiospermas em geral, plântulas originárias de embriões imaturos são comumente saprofiticas, parasitas ou simbióticas. Tais embriões podem alcançar completa maturidade durante o processo de germinação ou nas fases que antecedem a germinação (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Em ambos os casos, as mudanças somente ocorrem se as sementes são mantidas sob condições favoráveis para a germinação.

Diferenciação entre os dois tipos é extremamente difícil e o período requerido para os embriões alcançarem a maturidade varia de poucos dias a vários meses.

Em laboratório, sementes imaturas de algumas espécies terrestres de regiões temperadas, tais como *Calopogon tuberosus*, *Spiranthes cernua*, *S. sinensis*, *Bletilla hyacinthina*, *Disa uniflora*, *Microtis unifolia* e *Habenaria radiata*, apresentam rápida germinação e crescimento logo após retiradas da cápsula, e nessas espécies, nenhum mecanismo de dormência parece estar operativo (STOUTAMIRE, 1974). As

sementes tornam-se fotossinteticamente ativas em duas a três semanas quando embebidas em água destilada estéril, sendo que após esse período, o embrião torna-se não viável se as sementes não forem transferidas para meios de cultura adequados.

Vários trabalhos têm mostrado que a germinação de sementes de orquídeas epífitas obtidas a partir de cápsulas imaturas ou verdes é abundante, e seu emprego tem ocorrido de forma generalizada. LINDÉN (1992) salienta que a porcentagem de germinação aumentou sensivelmente quando foram utilizadas sementes provenientes de tais cápsulas e que essa alta porcentagem de germinação poderia ocorrer devido a uma dormência incompleta ou parcial, ou ainda, à ausência de inibidores. O mesmo autor argumenta que há estreita ligação entre o conteúdo de água e as altas taxas de germinação, evidenciando, assim, os diferentes níveis encontrados em sementes maduras e imaturas, já que o sucesso da germinação de sementes maduras implica na hidratação do embrião e a subsequente lixiviação ou inativação de inibidores. Com certeza, isso explica o tempo excessivamente longo para ocorrer germinação em sementes maduras, sendo necessário embebição por longo tempo para acelerar o processo.

Em relação ao tempo necessário para a ocorrência de germinação, RAO (1974), comparando sementes maduras e imaturas, detectou uma redução no período de germinação quando utilizou sementes imaturas. Houve diminuição nesse período, na faixa de 40-85 dias, quando comparado ao observado para sementes maduras nos gêneros *Aerides*, *Brassavola*, *Broughtonia*, *Cattleya*, *Doritis*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Renanthera*, *Vanda* e *Vanilla*.

YAM e WEATHERHEAD (1988) obtiveram germinação em duas semanas quando utilizaram sementes de cápsulas verdes de três meses, enquanto as sementes de cápsulas de seis meses levaram cinco semanas

para germinar. Esses autores argumentam que, para muitas espécies, o uso de cápsulas verdes é preferível porque as sementes são viáveis e a germinação é mais rápida.

ARDITTI et al. (1981) e HENRICH et al. (1981), igualmente obtiveram bons resultados quanto ao emprego de sementes imaturas de cápsulas verdes.

Segundo CARLSON (1940), a maior fonte de reservas em sementes de orquídeas é de lipídeos; análises químicas em sementes de *Cypripedium parviflorum* mostraram paredes celulares da testa contendo lignina e celulose e não foi detectado cutina. As células epidérmicas do embrião não são lignificadas e não possuem cutícula. Em algumas células do embrião foram observadas gotas de óleo mas nenhum amido, nitratos ou açúcares. O conteúdo mineral destas sementes apresenta concentrações em torno de 23ppm de K, 5,4ppm de Ca, 5,5ppm de Mg, 1,5ppm de Na e 8,8ppm de P, nas cinzas. Também apresentou traços de Al, B, Cu e Mn.

Em *Cattleya aurantiaca* tem sido mostrado que todas as células do embrião possuem reservas na forma de corpos lipídicos. Fora pequenos grãos dentro dos plastídios, não há amido ou outro carboidrato de reserva nas sementes (HEW, 1987). Isto parece ser verdadeiro para a maioria das orquídeas.

Embora evidências sugiram que orquídeas têm lipídios como reserva em sementes, glioxissomos não têm sido detectados em qualquer tempo durante a germinação (STOUTAMIRE, 1974). Essa aparente falta de maquinaria metabólica dificulta severamente a utilização das reservas lipídicas e sua subsequente conversão a carboidratos através da oxidação; nesse caso, a degradação de lipídeos ocorreria via oxidação. Isto pode explicar a taxa de respiração muito baixa de embriões de orquídeas (STOUTAMIRE, 1964). No gênero *Cattleya*, os corpos lipídicos estão estreitamente associados com mitocôndrias, e tem sido demonstrado que o

embrião pode converter aproximadamente 3% de 14C-2-acetato em açúcares (HEW, 1987). Poderia ser, portanto, que as reservas lipídicas seriam usadas lentamente na natureza para manter os protocormes até uma infecção endofítica ser estabelecida. Somente então, os protocormes se desenvolveriam em plântulas, produzindo folhas e raízes.

Na germinação de sementes imaturas de orquídeas, é possível que as mesmas apresentem intensa atividade metabólica e alto grau de hidratação, em oposição às sementes maduras, que necessitariam de um período prolongado de embebição e de ativação do complexo metabólico.

CONCLUSÕES

O processo de germinação em sementes de *Orchidaceae*, como aqui exposto, revela muitas etapas a serem elucidadas, já que muitos fatores contribuem para que a germinação ocorra:

- Em relação aos estádios de maturação da semente e de sua capacidade germinativa, estudos sobre as vias de síntese e degradação de lipídeos, análises dos ácidos graxos e medições de taxas respiratórias, podem fornecer informações bastante seguras para a multiplicação de espécimes dessa família, via semente;
- Espécies epífitas, litofíticas e terrestres possuem aspectos peculiares em relação aos fatores envolvidos na germinação de sementes maduras e imaturas;
- A dormência em sementes de orquídeas deve ser estudada sob o aspecto da ativação do sistema enzimático, bem como pelo suprimento de substâncias de crescimento, já que é responsável pelo lento desenvolvimento de algumas espécies em cultivo assimbiótico ou simbiótico;
- A reprodução e multiplicação de espécimes desta família, com grande interesse econômico ou botânico, somente serão

alcançados em sua plenitude se a formação e germinação das sementes, bem como o estabelecimento das plântulas, forem conhecidos detalhadamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. 1964a. On buried seed. Am. Orchid Soc. Bull. 33(1): 42-48.
- ARDITTI, J. 1967. Factors affecting the germination of seeds. Bot. Rev. 33(1): 1-97.
- ARDITTI, J. e ERNST, R. 1974. Reciprocal movement of substances between orchids and mycorrhizae. In: Anales de la 7ª Conferencia Mundial de Orquideologia. Medellin, Colombia. pp. 299-308.
- ARDITTI, J., MICHAUD, J.D. e OLIVA, A.P. 1981. Seed germination of north american orchids. I: Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. Bot. Gaz. 142(4): 442-453.
- CARLSON, M.C. 1940. Formation of the seed of *Cypripedium parviflorum*. Bot. Gaz. 102(2): 295-300.
- HARVAIS, G. e HADLEY, G. 1967b. The development of *Orchis purpurella* in symbiotic and inoculated cultures. New Phytol. 66: 217-230.
- HENRICH, J.E., STIMART, D.P. e ASCHER, P.D. 1981. Terrestrial orchid seed germination *in vitro* on a defined medium. J. Am. Soc. Hort. Sci. 106(2): 193-196.
- HEW, C.S. 1987. Respiration in orchids. In: ARDITTI, J. (Ed.), Orchid Biology, Reviews and Perspectives. Vol. IV. Comstock Publishing Associates (ed.), Ithaca, USA. pp. 227-259.
- KNUDSON, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1-25.
- KNUDSON, L. 1930. Flower produc-
- tion by orchids grown non-symbiotically. Bot. Gaz. 89: 192-199.
- KNUDSON, L. 1946a. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Am. Orchid Soc. Bull. 15(5): 214-217.
- LINDÉN, B. 1992. Two new methods for pretreatment of seed of northern orchids to improve germination in axenic culture. Ann. Bot. Fennici 29: 305-313.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A. 1989. The germination of seeds. 4th Edition. Pergamon Press (ed.), Oxford, England. 270 p.
- RAO, A.N. 1974. Tissue culture in the orchid industry. In: WITHNER, C.L. (ed.), The Orchids: Scientific Studies. John Wiley (ed.), New York, USA. pp. 44-69.
- STOUTAMIRE, W.P. 1964. Seeds and seedlings of native orchids. Michigan Bot. 3: 107-199.
- STOUTAMIRE, W.P. 1974. Terrestrial orchids seedlings. In: WITHNER, C.L. (ed.), The Orchids: Scientific Studies. John Wiley, New York, USA. pp. 101-128.
- WERBLIN, T.P. 1963. Advanced microscopy and orchid. Orch. Dig. 27(8): 340-342.
- WITHNER, C.L. 1953. Germination of "Cyps.". Orchid J. 2: 473-477.
- YAM, T.W. e WEATHERHEAD, M.A. 1988. Germination and seedling development of some Hong-Kong orchids. I. Lindleyana 3(3): 156-160.

(*) Pesquisador Científico,
Seção de Orquidário,
Instituto de Botânica.
Caixa Postal 4005, 01061-970, São
Paulo, SP.