

**Crescimento *in vitro* em diferentes meios de cultura:
avaliação do híbrido *Brassavola perrinii*
Lindl. x *Cattleya loddigesii* Lindl.**

Carla Chiapim; Thiago de Souza-Leal; Germana Marcelino Cordeiro;
Raquel Massaro e Cristiano Pedroso de Moraes
para correspondência: pedroso@uniararas.br

Resumo: A semeadura *in vitro* constitui ferramenta indispensável para propagação das principais espécies de orquídeas comerciais. O presente trabalho teve por objetivo analisar o desenvolvimento *in vitro* de *Brassavola perrinii* Lindl. x *Cattleya loddigesii* Lindl. mediante a avaliação do meio de cultura ½ MS, Hyponex® e Kristalon laranja®. Após 180 dias de cultivo, inferiu-se que o meio de cultura mais eficiente para a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de sementes foi Kristalon laranja.

Palavras-chave: Orchidaceae, germinação, híbrido, propagação *in vitro*.

Abstract: *In vitro* growth in different culture media: evaluation of the hybrid *Brassavola perrinii* Lindl. x *Cattleya loddigesii* Lindl. The *in vitro* culture is an important method for propagation of commercial orchid species. The objective of the present paper is to study the *in vitro* development of *Brassavola perrinii* Lindl. x *Cattleya loddigesii* Lindl. using as parameters for evaluation of ½ MS culture media, Hyponex® and Kristalon laranja®. After 180 days of culture, it was inferred that the most efficient media culture for the germination and development of seeds was Kristalon laranja.

Keywords: Orchidaceae, germination, hybrid, *in vitro* propagation.

Introdução

O emprego de técnicas de propagação *in vitro* possibilita a diminuição de coletas predatórias de orquídeas, permitindo-se a manutenção das populações naturais destas plantas. Dessa forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas que melhorem as condições de desenvolvimento das plântulas é muito importante. Assim, o meio de cultura é um fator determinante para o sucesso da propagação *in vitro* de orquídeas e demais espécies ornamentais.

As Orchidaceae apresentam como uma de suas principais características horticulturais a formação de híbridos, não somente interespecíficos, mas também, intergenéricos. Assim, a hibridação de orquídeas não segue o mesmo padrão de outras fanerógamas (Raposo, 1993). A produção de híbridos artificiais de orquídeas ocorre a mais de um século e estima-se a existência de mais de cem mil híbridos registrados.

Laeliinae é uma subtribo Neotropical de Orchidaceae, composta por mais de 40 gêneros, alguns deles favoritos dentre os colecionadores de orquídeas (Cunha *et al.*, 2011), tais como as espécies tradicionalmente identificadas como *Cattleya* (van den Berg *et al.*, 2005) e *Brassavola*. O cultivo de espécies destes gêneros apresenta grande importância para o agronegócio florícola mundial, principalmente, pela ampla beleza, morfologias exóticas, tamanho e durabilidade de suas flores, que podem atingir valores elevados no

mercado interno e externo, devido a serem muito procuradas por orquidófilos, paisagistas, decoradores de ambiente e cidadãos em geral (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2009). De acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, o nome dado a híbridos formados por espécies do gênero *Brassavola* e *Cattleya*, é *Brassocattleya*.

Vindo de encontro às necessidades do mercado florícola, a propagação *in vitro* de orquídeas além de acelerar a taxa de germinação de espécies naturais e híbridas, permite a obtenção de uma maior quantidade de mudas com maior aproveitamento de sementes. Além disso, tal forma de propagação tem sido utilizada no Brasil para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e conseqüentemente reduzir o custo, contribuindo assim, para salvar muitas espécies naturais que se encontram ameaçadas (Stancato *et al.*, 2001).

Infelizmente, não existe ainda um meio de cultura específico adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone. Em geral, é difícil explicar porque em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos, enquanto em outras não se tem obtido êxito (Ventura, 2002).

Assim, este trabalho teve como objetivo, avaliar o desenvolvimento de plântulas pós-germinação do híbrido primário *Brassavola perrinii* Lindl. X *Cattleya loddigesii* Lindl., em diferentes meios de cultura, com diferentes concentrações de NPK, durante o período de 180 dias de cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

Para a realização do trabalho, quatro flores de diferentes indivíduos de *Brassavola perrinii* Lindl. foram polinizadas com somente uma unidade de massas polínicas advindas do polinário de uma flor de *Cattleya loddigesii* Lindl. (devido ao tamanho da cavidade estigmática da planta mãe) em Abril de 2011. Quatro meses após a autopolinização, foram coletadas sementes dos frutos maduros, as quais foram levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Herminio Ometto – Uniararas, para o início dos experimentos germinativos.

Foram preparados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro composto por metade da concentração de macronutrientes do meio MS, o qual foi usado como controle, e os outros dois por meio Hyponex® (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja® (NPK 6-12-36) a 2 g.L⁻¹, acrescidos de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, 30 g.L⁻¹ de sacarose com pH ajustado para pH 5,8 antes da adição de 7 g.L⁻¹ de ágar-banana. Logo após, 50 mL de cada meio de cultura foram vertidos em quatro frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos.

Para a desinfestação das sementes, foi utilizado hipoclorito de sódio a 5%, no qual, as sementes foram submetidas à agitação durante cinco minutos em tubos Eppendorf®. Posteriormente, os tubos foram mergulhados em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada com o auxílio de seringa de 1 mL. Ainda utilizando-se da seringa, as sementes, juntamente com 1 mL de água destilada, foram depositadas nos frascos contendo os meios de cultura. Os frascos semeados foram fechados com tampa plástica transparente e mantidos durante 180 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura de 25 ± 2°C, com um fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 116 μmol.m⁻².s⁻¹.

Foram semeados quatro frascos por tratamentos sendo inoculadas, por recipiente, 1 g de sementes. Para a análise estatística, foram utilizados vinte indivíduos de cada recipiente, retirados aleatoriamente dos meios de cultura.

Os dados referentes à altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), peso da matéria fresca (MF) e matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CR) e maior folha (CF), das vinte plantas de cada frasco, foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Os resultados demonstraram que as plantas do híbrido *Brassocattleya* cultivadas em meio de cultura a base de fertilizante Kristalon laranja®, apresentaram as maiores médias para as variáveis: altura das plântulas (AP), comprimento da maior folha (CF), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) quando comparados aos meios MS com metade da concentração de macro-nutrientes e à base de fertilizante Hyponex®. Com relação à média obtida para a variável comprimento da maior raiz (CR), o meio de cultivo à base do fertilizante Hyponex®, apresentou a maior média em relação aos demais. Para a variável número de raízes (NR), os meios de cultivo suplementados com os fertilizantes Kristalon laranja® e Hyponex® não apresentaram diferenças significantes entre si (Tab. 1 e Fig. 1)

Tabela 1. Valores médios para a altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), matéria fresca (MF), matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CR) e comprimento da maior folha (CF) de *Brassavola perrinii* X *Cattleya loddigesii*, após 180 dias cultivo em três meios de cultura avaliados: MS, com metade da concentração de macronutrientes; HY, Hyponex®; KR, Kristalon laranja®. DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação.

VARIÁVEIS AVALIADAS						
Meios de Cultura	AP (cm)	NR	MF (g)	MS (g)	CR (cm)	CF (cm)
MS	22.31C ¹	2.00 B	0.08 C	0.06 C	9.69 C	12.63C
HY	61.47 B	3.62 A	0.37 B	0.08 B	21.12 A	22.17 B
KR	69.11 A	3.68 A	0.48 A	0.14 A	18.87 B	39.99 A
DP	4.71	0.48	0.09	0.56	0.92	0.78
CV %	6.38	18.11	10.32	19.61	0.33	1.63

¹Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Em cultivo *in vitro*, um dos principais nutrientes essenciais e ativos é o nitrogênio, o qual é absorvido, principalmente, na forma de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺), assim, o crescimento das culturas, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos são influenciados diretamente pela quantidade e a fonte de N (Russowski & Nicolosso, 2003).

Os valores médios encontrados para as variáveis estão de acordo com os obtidos para a espécie *Cattleya loddigesii* Lindl. (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2009) e para o híbrido

terciário *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* Merril. X *Laelia purpurata* Lindl.) (Cordeiro *et al.*, 2011), nos quais o meio de cultura à base de fertilizante

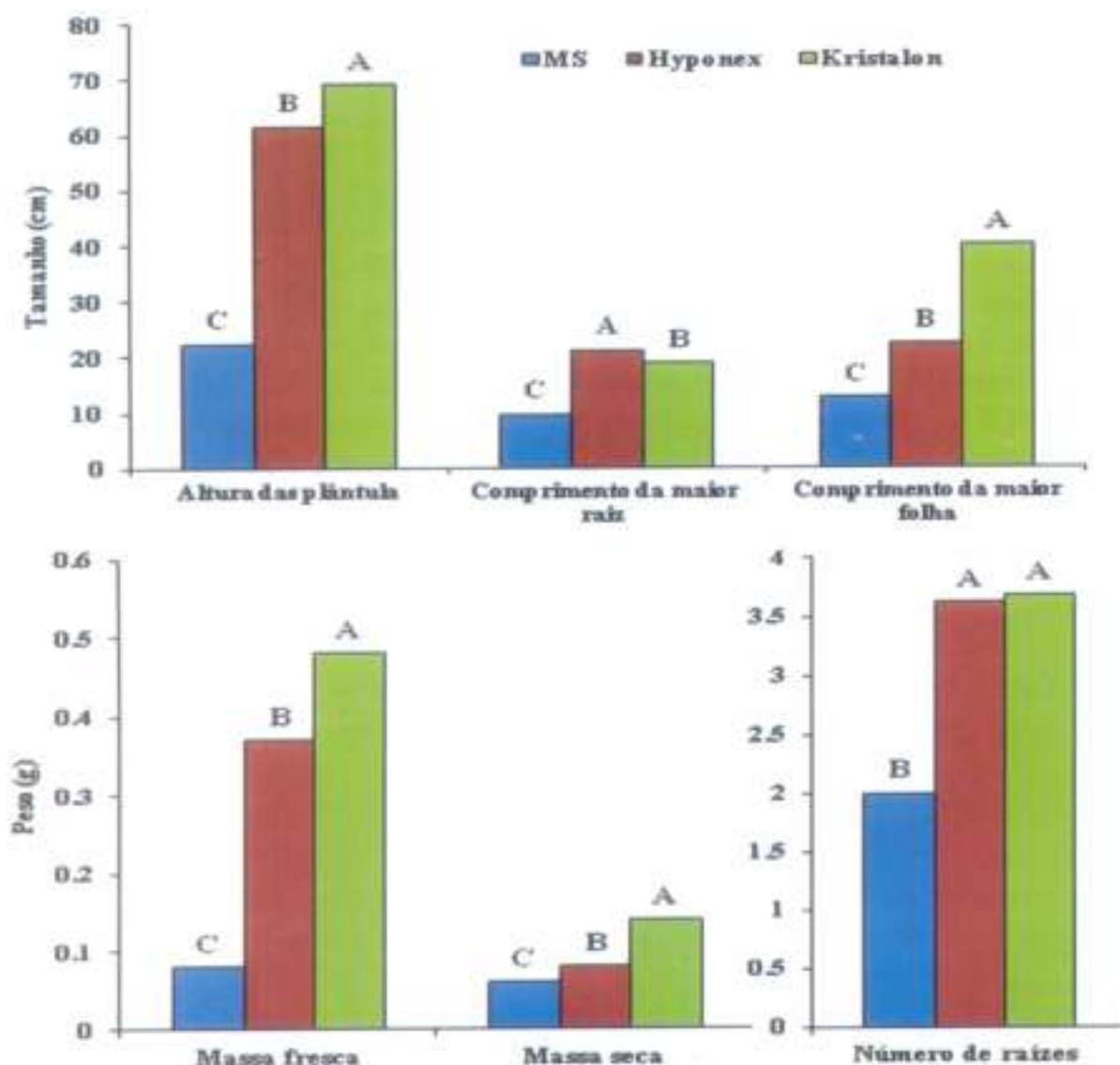


Figura 1 - Valores médios para a altura das plântulas, número de raízes, matéria fresca, matéria seca, comprimento da maior raiz e comprimento da maior folha de *Brassavola perrinii* X *Cattleya loddigesii*, após 180 dias cultivo em três meios de cultura avaliados: MS, com metade da concentração de macronutrientes; HY, Hyponex®; KR, Kristalon laranja®. Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Kristalon laranja® apresentou as maiores médias para as variáveis altura das plântulas, matéria fresca e matéria seca, comprimento da maior raiz e comprimento da maior folha, quando comparados aos meios MS com metade da concentração de macro-nutrientes e Hyponex®, fato este atribuído aos menores percentuais de nitrogênio amoniacal presentes nestes meios de cultivo.

Os resultados também podem ser explicados pela existência de uma relação ocorrente entre as variáveis analisadas em plântulas submetidas a doses balanceadas de nitrogênio nítrico e amoniacal, em que se obtém, principalmente, aumento de matéria fresca, matéria seca e altura de plântulas, com ênfase no desenvolvimento do sistema radicular (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2009). Esta afirmação é confirmada por resultados semelhantes

obtidos em orquídeas terrestres do gênero *Cymbidium* (Pan & Chen, 1994) onde foi constatado que doses semelhantes das duas fontes de nitrogênio influenciaram positivamente as variáveis acima citadas, principalmente em relação à variável comprimento da maior raiz (CR), como o ocorrido neste trabalho.

Em *Cattleya loddigesii* a utilização de meio de cultivo à base de fertilizante Hyponex®, apresentou maior média em relação à variável número de raízes (NR) (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2009), contudo, no presente estudo, o meio de cultivo a base dos fertilizantes Kristalon laranja® e Hyponex® não apresentaram significância estatística entre as médias obtidas, como também relatado para o híbrido terciário *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* Merril. X *Laelia purpurata* Lindl.) (Cordeiro *et al.*, 2011). Tal resultado também é discordante com os encontrados para *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. (Kanashiro *et al.*, 2007), na qual o número de raízes decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no meio MS modificado. A mesma tendência foi constatada em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. (Russowski & Nicolosso, 2003), na qual foi obtido maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo em maiores concentrações. Tais diferenças em relação aos resultados encontrados para o híbrido estudado podem estar relacionadas com a variabilidade existente no desenvolvimento de orquídeas de distintos genótipos cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio (Singh, 1992). Altas concentrações de fosfato de sódio, como as constatadas para os fertilizantes Hyponex® e Kristalon laranja®, diminuem o crescimento *in vitro* de diferentes espécies vegetais, possivelmente, porque o sódio e alguns micro-elementos são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida (Pasqual, 2001). Também, a taxa de incorporação de íons fosfato, assim como os de nitrogênio, depende do genótipo das espécies de orquídeas (Chen *et al.*, 2000).

Conclusão

O meio de cultura a base de fertilizante Kristalon laranja® demonstrou ser o mais eficaz no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Brassavola perrinii* X *Cattleya loddigesii* considerando-se altura da planta, comprimento da maior folha, matéria fresca e matéria seca, podendo ser utilizado comercialmente por apresentar maior facilidade e baixo custo de produção em relação ao meio MS com metade da concentração de macronutrientes. O meio à base do fertilizante Hyponex® pode ser utilizado quando há necessidade de desenvolvimento de sistemas radiculares.

Referências Bibliográficas

- Chen, Y.; C. Chang & W. Chang. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36: 420-423.
- Cordeiro, G.M.; C. Pedroso-de-Moraes; R. Massaro & T. Cunha. 2011. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindl.). *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, 18: 22-28.

- Cunha, T.; G.M. Cordeiro; R. Massaro; L.F. Dezan & C. Pedroso-de-Moraes. 2011. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. *Scientia Plena*, 7: 1-5
- Kanashiro, S.; R.C.S. Ribeiro; A.N. Gonçalves; C.T.S. Dias & T. Joecys. 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. *Hoehnea*, 34: 59-66.
- Pan, R.C. & J.X. Chen. 1994. Effects of nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen on growth and development in *Cymbidium sinensis*. *Acta Botanica Yunnanica*, 16: 285-290.
- Pasqual, M. 2001. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE.
- Pedroso-de-Moraes, C.; J.A. Diogo; N.P. Pedro; R.I. Canabrava & G.A. Martini; M.A. Marteline. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências*, 7: 67-69.
- Raposo, J.G. 1993. Questões práticas de nomenclatura de orquídeas. Editora Ave-Maria, São Paulo.
- Russowski, D. & F.T. Nicoloso. 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência Rural*, 33: 57-63.
- Singh, F. 1992. Micropropagation of orchids *Scaphiglotis plicata* and *Epidendrum radicans*. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-tech and micropropagation IV*. Springer. Berlin Heidelberg: 223-245.
- Stancato, G.C. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7: 25-33.
- van den Berg, C. *et al.* 2005. Subtribe Laeliinae. In *Genera Orchidacearum*. Vol. IV. Oxford University Press, Oxford: 181-316.
- Ventura, G.M.; J.M.M. Dias; L.S. Teixeira; S.V. Carvalho; Y.S. Motoike; F.R. Novais & R.P. Cecon. 2002. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. *Revista Ceres*, 47: 613-628.


flores nutrição vegetal

www.begflores.com.br
contato@begflores.com.br
(31) 3892-4967



Tenha excelentes resultados com a linha **Orchidées B&G**

Conhecimento e inovação para produzir os melhores adubos para as suas flores!