

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Germana Marcelino Cordeiro^{1,3}, Cristiano Pedroso de Moraes³, Raquel Massaro^{2,3},
Tatiane da Cunha²

RESUMO - A propagação massal via sementeira *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 *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* 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 o desenvolvimento *in vitro* foi Kristalon laranja.

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

IN VITRO DEVELOPMENT OF *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

ABSTRACT - The massal propagation through sowing seeds is an important method for propagation of commercial orchid species. The objective of the present work is to study the *in vitro* development of the *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* 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 *in vitro* development was Kristalon laranja.

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

¹Mestranda Depto de Ciências Biológicas – Fisiologia e Bioquímica de Plantas – ESALQ/USP, Piracicaba, Caixa Postal 199. 13506-900. Piracicaba - SP, Brasil; ²Laboratório de Botânica e Meio Ambiente - Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIARARAS) - discentes de Iniciação Científica. Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jd. Universitário, Araras - SP, CEP: 13607-339; ³Laboratório de Botânica e Meio Ambiente - Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIARARAS) – Grupo de estudos de Biotecnologia e Produção Vegetal. Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 - Jd. Universitário, Araras - SP, CEP: 13607-339. pedroso@uniararas.br

1. INTRODUÇÃO

A preocupação crescente com a preservação do meio ambiente, associada ao emprego da técnica de propagação *in vitro*, possibilita a expectativa de que as coletas predatórias das orquídeas sejam minimizadas, permitindo-se a manutenção das populações naturais destas plantas. Assim, o meio de cultura é um fator determinante para o sucesso da propagação *in vitro* de orquídeas e demais espécies ornamentais (SILVA et al., 2009).

As orquídeas apresentam como uma de suas principais características hortícolas a formação de híbridos, não somente entre as espécies, mas também entre os gêneros, ou até mesmo, mais raramente entre as subtribos. Portanto, a hibridação nas Orchidaceae não segue o mesmo padrão como nos outros grupos de plantas floríferas (RAPOSO, 1993). A produção de híbridos artificiais de orquídeas vem ocorrendo a mais de um século, sendo estimada a existência de mais de cem mil híbridos registrados (WILLIAMS e KRAMER, 1980).

Laeliinae é uma subtribo neotropical de Orchidaceae, composta por mais de 40 gêneros, alguns deles favoritos dentre os colecionadores de orquídeas, tais como *Cattleya* e *Laelia* (van den BERG et al., 2005). O cultivo de espécies destes gêneros é de grande importância para o agronegócio florícola mundial, devido principalmente, a ampla capacidade de recombinação genética, beleza, forma, tamanho e durabilidade de suas flores, além de atingirem altos preços no mercado interno e externo, procurados por colecionadores, orquidófilos, decoradores de ambiente e cidadãos comuns

(BECHTEL et al., 1992; PAULA e SILVA, 2001; HSU, 2003; ZANENGA-GODOY e COSTA, 2003; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a). De acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, o nome dado a híbridos formados por espécies do gênero *Laelia* e *Cattleya*, é *Laeliocattleya* (RAPOSO, 1993).

Dessa forma a propagação *in vitro* de orquídeas além de acelerar a taxa de germinação de espécie naturais e híbridas, permite a obtenção de uma maior quantidade de mudas com maior aproveitamento de sementes (MARTINI et al., 2001). Além disso, a propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e consequentemente reduzir o custo. Contribuindo assim, para salvar muitas espécies que se encontram ameaçadas (STANCATO et al., 2001).

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 logrado êxito (VENTURA et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de plântulas pós-germinação do híbrido terciário *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindl.), em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e em dois meios complexos, compostos pelos fertilizantes Hyponex (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja (NPK 6-12-36), após o período de 180 dias de cultivo *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, cinco flores de diferentes indivíduos de *Cattleya amethystoglossa* Lindl. foram polinizadas com pólen do híbrido secundário *Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindl. em novembro de 2008. Seis meses após a polinização, foram coletadas sementes dos frutos maduros, as quais foram levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas.

Foram preparados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro composto por metade da concentração de macronutrientes do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), o qual foi usado como controle, e os outros dois por meio Hyponex e Kristalon laranja a 2 g L^{-1} , acrescidos de 1 g L^{-1} de carvão ativado, 30 g L^{-1} de sacarose com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7 g L^{-1} de agar-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 (ARDITTI e ERNEST, 1992).

Para a desinfestação das sementes, optou-se pela utilização de hipoclorito de sódio a 5%, as quais foram submetidas à agitação manual na solução 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 autoclavada 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 (ARDITTI e ERNEST, 1992). Os frascos com o meio de cultura e as sementes foram fechados com tampa plástica transparente e mantidos durante 180 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente $116 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Foram utilizados quatro frascos por tratamentos, onde 1 g de sementes foi inoculado por recipiente. Para a análise estatística, foram utilizados 20 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 20 plantas de cada frasco, foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pela utilização do software estatístico BioEstat 5. Vale ressaltar que a porcentagem de germinação estimada para cada frasco foi de 75%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as plantas do híbrido *Cattleya amethystoglossa* Lindl. X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindl.), 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 $\frac{1}{2}\text{MS}$ e a base de

fertilizante Hyponex. Com relação à média obtida para a variável comprimento da maior raiz (CR), o meio de cultivo a base do fertilizante Hyponex, apresentou a maior média em relação aos demais meios. 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 (Tabela 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 *Cattleya amethystoglossa* X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata*), após 180 dias cultivo em três meios de cultura avaliados ½MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com metade da concentração de macronutrientes (HY, Hyponex; KR, Kristalon). DP, Desvio Padrão; CV, Coeficiente de Variação.

Meios de Cultura	Variáveis Avaliadas					
	AP (cm)	NR	MF (g)	MS (g)	CR (cm)	CF (cm)
MS	24,11 C ¹	1,53 B	0,05 C	0,005 C	7,32 C	8,82 C
HY	64,88 B	3,40 A	0,27 B	0,06 B	37,43 A	13,39 B
KR	67,07 A	3,66 A	0,32 A	0,09 A	36,43 B	38,65 A
DP	3,89	0,5	0,12	0,005	0,02	0,22
CV %	6,21	20,63	8,78	20,30	0,17	1,84

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

Estudos *in vitro* realizados por Stancato et al. (2001), demonstraram que a diminuição dos custos de produção de plantas ornanamentais é possível através da simplificação dos meios de culturas. O uso de fertilizantes comerciais tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies de orquídeas, como observado por Pedroso-de-Moraes et al. (2009 a,b) para as orquídeas *Cattleya loddigesii* e *Cattleya tigrina*, onde a utilização dos fertilizantes Hyponex e Kristalon laranja permitiram o desenvolvimento de plantas em larga escala e com menor custo. Além disso, Oliveira e Faria (2005), em estudos comparativos entre

os meios Ms, Knudson C, Vancin e Went e meios à base de adubos NPK (10-5-5) e NPK (10-30-20) na concentração de 3,0 g.L⁻¹ obtiveram as melhores médias para todas as variáveis fitotécnicas analisadas em relação aos meio de cultura tradicionais para as espécies *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*.

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⁺) (SAKUTA et al., 1987), 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 e NICOLOSO, 2003). Ainda, o efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas em orquídeas é marcante, sendo que o nitrato, como única fonte de nitrogênio, em geral, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies da família (REINERT e MOHR, 1967).

Os valores médios observados para as variáveis estão de acordo com os obtidos para a orquídea *Cattleya loddigesii* (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a), no qual o meio de cultura a base de fertilizante Kristalon laranja apresentou as maiores médias para as variáveis; altura das plântulas (AP), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CR) e comprimento da maior folha (CF), quando comparados aos meios $\frac{1}{2}$ MS 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 quadrática entre as variáveis analisadas em plântulas submetidas a doses balanceadas de nitrogênio nítrico e amoniacal, em que se obtêm, principalmente, aumento de matéria fresca, matéria seca e altura de plântulas, com ênfase no desenvolvimento do sistema radicular (BERNARDI et al., 2004; PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a). Tal fato é corroborado pelas porcentagem de nitrogênio nítrico (0,29%, 0,33%, 0,35%) e amoniacal (0,18%, 0,23% e 0,54%) encontradas para a totalidade de macronutrientes que compõem o meio $\frac{1}{2}$ MS e os fertilizantes Hyponex e Kristalon laranja, respectivamente. Esta afirmação é confirmada por resultados semelhantes

obtidos em orquídeas terrestres do gênero *Cymbidium* (WEN e HEW, 1993; PAN e CHEN, 1994; POWELL et al., 1988) 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 a base de fertilizante Hyponex, apresentou maior média em relação à variável número de raízes (NR) (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009a), contudo, no presente estudo, o meio de cultivo a base dos fertilizantes Kristalon laranja e Hyponex não apresentaram significância estatística entre as médias obtidas. Tal resultado também é discordante com os encontrados para *Aechmea blanchetiana* (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* (RUSSOWSKI e NICOLOSO, 2003), na qual foi obtido maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo nas 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). Ainda, altas concentrações de fosfato de sódio, como as constatadas para os dois fertilizantes, 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).

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura a base de fertilizante Kristalon laranja demonstrou ser o mais eficaz no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya amethystoglossa* X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata*) 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 ½MS.

O meio a base do fertilizante Hyponex pode ser utilizado quando há necessidade de desenvolvimento de sistemas radiculares.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 682p.
- BECHTEL, H.; CRIBB, P.; LAUNERT, E. **The manual of cultivated orchid species**. 3 ed., Cambridge: The Mit Press, 1992. 236p.
- BERNARDI, A.C.; FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; UNEMOTO, L.K.; ASSIS, A.M. Desenvolvimento vegetativo de *Dendrobium nobile* Lindl. fertirrigadas com diferentes concentrações da solução nutritiva de Saruge. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.1. p.13-20, 2004.
- CHEN, Y.; CHANG, C.; CHANG, W. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.420-423, 2000.
- HSU, C.C. **Protocorm-like body induction and plant regeneration from etiolated leaves of *in vitro* Phalaenopsis**. 2003. 88 p. Tese (Doutorado em Agricultura) - Institute of Tropical Agriculture and Intl Cooperation, University of Science & Technology, Pingtung.
- KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.C.S.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v.34, n.1, p.59-66, 2007.
- MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1319-1324, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R.L.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using tradicional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 27, p.1-5, 2005.
- PAN, R.C.; CHEN, J.X. Effects of nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen on growth and development in *Cymbidium sinensis*. **Acta Botanica Yunnanica**, v.16, n.3, p.285-290, 1994.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.74p.
- PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2 ed., Viçosa: Editora UFV, 2001. 63p.
- PEDROSO-DE-MORAES, C.; DIOGO, J.A.; PEDRO, N.P.; CANABRAVA, R.I.; MARTINI, G.A.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, p.67-69, 2009a.
- PEDROSO-DE-MORAES, C.; SANTAMBROSIO, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; SOUZA-LEAL, T. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaios em Ciência**, v.13, p.57-65, 2009b.
- POWELL, C.L.; CALDWELL, K.I.; LITTLER, R.A.; WARRINGTON, I. Effect of temperature regime and nitrogen fertilizer level on vegetative and reproductive bud development in *Cymbidium* orchids. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.552-556, 1988.

- RAPOSO, J.G. **Questões práticas de nomenclatura de orquídeas**. São Paulo: Editora Ave-Maria, 1993. 80p.
- REINERT, R.A.; MOHR, H.C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.91, p.664-671, 1967.
- RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v.33, p.57-63, 2003.
- SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, v.71, p.459-463, 1987.
- SILVA, E.F.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meio de cultura Knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Scientia Agrária**, v.10, n.4, p.267-274, 2009.
- SINGH, F. Micropropagation of orchids *Scaphiglotis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-tech and micropropagation IV**. Springer. Berlin Heidelberg. New York, v.20, 1992. Pp.223-245.
- 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, n.1, p.25-33, 2001.
- van den BERG, C. *et al.* Subtribe Laeliinae. In: PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W., RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. Vol. IV. Oxford: Oxford University Press, 2005. Pp.181-316.
- VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHO, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R.P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v.47, n.286, p.613-628, 2002.
- ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C.G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasílica**, v.17, n.1, p.101-118, 2003.
- WEN, Z.Q.; HEW, C.S. Effects of nitrate and ammonium on photosynthesis, nitrogen assimilation and growth of *Cymbidium sinense*. **Journal of the Singapore National Academy of Science**, v.20, n.21, p.21-23, 1993.
- WILLIAMS, B.; KRAMER, J. **Orchids for everyone: a practical guide to the home cultivation of over 200 of the world's most beautiful varieties**. Sydney: Lansdowne Press. 1980. 208p.