

Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados

T. Cunha¹; G.M. Cordeiro¹; R. Massaro¹; L.F. Dezan¹; C. Pedroso-de-Moraes^{1,2}

¹ Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Av. Dr Maximiliano Baruto, 500, 13607-339, Araras-SP

² Depto de Botânica, IBUNESP, Rio Claro, Caixa Postal 199, 13506900 Rio Claro-SP, Brasil

pedroso@uniararas.com.br

(Recebido em 23 de setembro de 2010; aceito em 28 de julho de 2011)

A propagação massal via sementeira *in vitro* constituiu ferramenta indispensável para propagação das principais espécies de orquídeas comerciais, por exemplo, *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe, espécie de grande importância na obtenção de híbridos. Devido a este fator, o presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos do desenvolvimento *in vitro* desta espécie mediante a avaliação do efeito do meio de cultura ½MS, e de dois meios à base de fertilizantes, Hyponex e Kristalon laranja. Após 180 dias de cultivo, inferiu-se que o meio de cultura mais eficiente para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas foi o meio Hyponex, que apresentou as maiores médias para todas as variáveis biométricas avaliadas, podendo dessa forma, ser utilizado comercialmente por apresentar menor custo de produção.

Palavras-Chave: Desenvolvimento *in vitro*, híbridos, orquídeas.

The massal propagation through sowing seeds is an important method for propagation orchid species of great commercial importance, like *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe, the one widely used to obtain hybrids. The objective of the present work is to study some aspects of the *in vitro* development of this species using as parameters for evaluation, the effect of ½MS culture media and two media based on fertilizers, Hyponex and Kristalon laranja. After 180 days of culture, it was inferred that the most efficient media culture for development of seedlings was Hyponex, that presented higher medias for all biometric evaluations. This culture medium is able to be used in way commercially to present low production costs.

Keywords: Development *in vitro*, hybrids, orchid.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam como uma de suas principais características horticulturais a formação de híbridos, não somente entre as espécies, mas também entre gêneros, ou até mesmo, mais raramente entre subtribos. Portanto, a hibridação nas Orchidaceae não segue o mesmo padrão como nos outros grupos de plantas floríferas [1]. 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 [2].

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* [3]. 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 [4, 5, 6]. 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* [1].

Laeliocattleya schilleriana Rolfe, constitui híbrido primário obtido por Rolf Altenburg em 29 de Junho de 1959, ao realizar o cruzamento entre as orquídeas nacionais *Laelia purpurata* Lindl. e *Cattleya intermedia* Grah.[7]. Tal híbrido assume dentre as espécies comercializadas, altos valores de mercado, variando seu valor de R\$ 50,00 à R\$ 75,00 de acordo com a cultivar desejada, ou seja, qual padrão de coloração a planta apresenta [8].

A sementeira *in vitro*, de orquídeas, constitui uma técnica bastante relevante do ponto de vista comercial. A cultura *in vitro* resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação

com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes espécie-específicos [9].

Em meios de cultivo, um dos principais nutrientes essenciais e ativos é o nitrogênio, o qual é absorvido, principalmente na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) [14], assim, o crescimento das culturas *in vitro*, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos são influenciados diretamente pela quantidade e a fonte de N [15].

Segundo [16], o efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas em orquídeas é marcante, sendo que o nitrato, como a única fonte de nitrogênio, em geral, sustenta a taxa de crescimento em muitas espécies da família. Contudo, SINGH [17] sugere que o desenvolvimento de espécies de orquídeas em relação à fonte de nitrogênio em meios de cultivo pode variar de acordo com o hábito ou genótipo.

A falta de conhecimento e de informações em relação à nutrição de orquídeas, leva aos orquicultores, a empregar meios de cultivo complexos, com diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento [10], elevando os custos desta forma de propagação [6]. Estudos *in vitro*, realizados por [11], demonstram que a diminuição de custos é possível, pela simplificação dos meios de cultura atuais, principalmente pelo emprego de fertilizantes como base de meios de cultura, visando produção em larga escala de orquídeas.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento do híbrido *Lc. schilleriana* em meio de cultura MS [12] composto por metade da concentração de macro-nutrientes, e em dois meios complexos, compostos pelos fertilizantes Hyponex® (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja® (NPK 6-12-36), durante o período de 180 dias de cultivo *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, cinco flores de diferentes indivíduos de *Laelia purpurata* Lindl. foram polinizadas pelo uso de cinco polínários completos (compostos por quatro políneas cada) de *Cattleya intermedia* Grah em setembro de 2008. Seis meses após a autopolinização, foram coletadas sementes dos frutos maduros, as quais foram levadas ao Laboratório de Botânica e Estudos Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas.

Foram avaliados três tipos de meios de cultura, sendo o primeiro composto por metade da concentração de macro-nutrientes do meio MS [12], 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 pH 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 [13].

Para a desinfestação das sementes, optou-se pela utilização de hipoclorito de sódio a 5%, as quais foram submetidas à agitação na solução durante cinco minutos, em tubos para centrífuga. 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 [13].

Foram semeados quatro frascos por tratamentos sendo inoculadas, por recipiente, 1g de sementes, totalizando ao final do experimento, foram obtidas aproximadamente 50 plântulas por frasco.

Os frascos, após a inoculação das sementes, foram vedados com tampa plástica transparente e mantidos durante 180 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura constante de 25°C , sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente $116 \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Foram avaliados os seguintes parâmetros quantitativos e biométricos: número de raízes (NR), comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da maior folha (CMF), massa fresca da plântula inteira (MFP) e massa seca da plântula inteira (MSP). As medidas foram obtidas utilizando-se de paquímetro digital (Digimess 100A) e balança analítica (Gehaka BG 400). Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Lilliefors para normalidade dos resíduos da ANOVA. Como essa

pressuposição foi atendida para todas as medidas analisadas, a análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) pela utilização do aplicativo BioEstat 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise de variância demonstraram que o meio cultivo a base do fertilizante Hiponex® apresentou as maiores médias para todas as variáveis. Por sua vez, o meio de cultivo a base do fertilizante Kristalon laranja®, apresentou as médias mais baixas, sendo, portanto, o meio MS ½macro-nutrientes, o meio de cultivo a apresentar valores intermediários em relação aos outros dos meios (Tab1).

Tabela 1: Valores médios obtidos das variáveis quantitativas e biométricas avaliadas para: comprimento total das plântulas (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da maior folha (CMF), matéria fresca da plântula inteira (MFP), matéria seca da plântula inteira (MSP) e número de raízes (NR) de *Lc. Schilleriana* após 180 dias cultivo em três meios de cultura avaliados MS com metade da concentração de macro-nutrientes; HY, Hyponex®; KR, Kristalon®. DMS = Desvio Médio Padrão; CV(%) = Coeficiente de Variação.

Meios de Cultura	CTP (cm)	CPA (cm)	CMR (cm)	CMF (cm)	MFP (g)	MSP (g)	NR
½ MS	32.05 B ¹	22.11 B	15.58 B	16.27 B	0.17 B	0.02 B	2.26 B
HY	86.86 A	33.43 A	50.47 A	20.44 A	0.43 A	0.07 A	3.86 A
KR	22.05 C	20.16 C	3.35 C	14.55 C	0.15 B	0.01 C	1.66 C
DMS	0.32	0.19	0.17	0.17	0.01	0.001	0.43
CV%	0.90	0.91	4.81	0.90	8.46	3.17	19.52

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

Os valores médios obtidos para as variáveis diferem dos descritos por [6], em trabalho semelhante com a orquídea *Cattleya loddigesii*, nos quais o meio de cultura à 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 (CMR) e maior folha (CMF), quando comparados aos meios MS ½macro-nutrientes e Hyponex®, fato este atribuído, às menores percentagens de nitrogênio amoniacal destes meios de cultivo. Entretanto, resultados semelhantes foram obtidos por [18] para a orquídea *Brassavola perrini* e para o híbrido *Brassavola perrini X Epidendrum ibaguense*, nas quais o meio de cultivo a base de fertilizante Hyponex® suplementado com polpa de banana e carvão ativado, apresentou maior desenvolvimento *in vitro* para todas as variáveis analisadas e maior taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização das plântulas das duas espécies.

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho tentem a corroborar com as observações de [16], pois a análise da totalidade dos sais existentes nos meios de cultivo aponta para as seguintes percentagens de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) respectivamente: Hyponex®: 11,8% e 2,1%, MS ½macro-nutrientes: 9,6% e 4,7% e Kristalon Laranja®: 7,2% e 6,2% [19, 6].

Em relação à variável número de raízes (NR), assim como para este trabalho,[6], encontrou maior valor médio para plântulas da orquídea *Cattleya loddigesii*, quando do uso de meio cultivo à base de fertilizante Hiponex®. Novamente, a fonte de nitrogênio possivelmente seja a responsável por tais resultados, pois segundo [20], para a bromélia *Aechmea blanchetiana*, o número de raízes apresentadas por plântulas em cultivo *in vitro*, decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no meio MS modificado. Resultados semelhantes, para a variável, número de raízes, foram encontrados por [15], trabalhando com *Pfaffia glomerata*, os quais obtiveram maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo nas maiores concentrações. Ainda, em relação a esta variável, [21] sugerem que a absorção de um dado nutriente pode ser influenciada por outro. Por exemplo, concentrações de 1.000 mg.L^{-1} de KCl, geraram um incremento no número de raízes na micropropagação do porta-enxerto de videira “Kobber”, por permitir maior assimilação de nitrogênio [22].

Com relação a concentrações de potássio, [23], observaram que a combinação de KCl com K₂SO₄, ambos na concentração de 500 mg.L⁻¹ promoveu maior crescimento *in vitro* em plântulas de *Cattleya loddigesii*, exceto no comprimento de raízes, que foi superior na presença de 500 mg.L⁻¹ de KCl sem K₂SO₄. O autor, ainda propõe uma correlação com o fósforo, sendo que sua deficiência no meio de cultura conduz a hiperidricidade e ao decréscimo na taxa de absorção de fosfato.

Segundo [24] altas concentrações de fosfato de sódio 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. Tal fato corrobora com as observações de [25] de que em várias espécies de orquídeas a taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura.

4. CONCLUSÃO

O meio de cultivo à base de fertilizante Hyponex® apresenta maior eficácia no desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* pode ser utilizado comercialmente para a produção *in vitro* da espécie por apresentar maior facilidade de manuseio e menor custo de produção.

-
1. RAPOSO, J.G. *Questões práticas de nomenclatura de orquídeas*. Editora Ave-Maria, São Paulo. 80p.(1993)
 2. WILLIAMS, B.; KRAMER, J. *Orchids for everyone: a practical guide to the home cultivation of over 200 of the world's most beautiful varieties*. Salamander. 221p.(1980)
 3. van den BERG, C. *et al.* Subtribe Laeliinae. Pp. 181–316. In: PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W., RASMUSSEN, F.N. *Genera Orchidacearum*. Vol. IV. Oxford University Press, Oxford. (2005).
 4. BECHTEL, H.; CRIBB, P.; LAUNERT, E.; *The manual of cultivated orchid species*. 3 ed., The Mit Press, Cambridge, (1992).
 5. 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).
 6. 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. (2009).
 7. WHITLOW, C. E. Fundamentals in breeding for blue *Cattleya* and *Laeliocattleya* hybrids, with recent notes on new developments. *The Orchid Digest*, v.36, n.6, p. 201-204.(1972).
 8. ORQUIDÁRIO CAIANA. Lista de preços. Disponível em http://portalacao.com.br/lista_caiana/matrizizes_codigo_certa.htm Acesso: 15 jan. (2009).
 9. MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.10. p13-16. (2001).
 10. VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHOS, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R.P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. *Revista Ceres*, v.47, n. 286, p.613-628. (2002).
 11. STANCATO, G.C.; BELMELMONS, P.F.; VEGRO, C.R.L. 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, p.25-33. (2001).
 12. MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A A revised médium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497.(1962).
 13. ARDITTI, J.; ERNEST, R. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley & Sons.682p.(1992)
 14. 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).
 15. 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).

16. 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).
17. 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, p. 223-245. (1992).
18. VIDOZ, M.L.; FLACHSLAND, E.A.; REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Comportamiento *ex vitro* de Plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de Tres Híbridos Intergenéricos. *Ciencia y Técnica*, v.1, p.12-15. (2008).
19. ICHIHASHI, S. Studies on the media for orchid seed germination: influence of the characteristics of some culture media on the growth of orchid seedlings. *Japanese Journal of Horticultural Science Society*, v.48, n. 3, p. 345-352. (1979).
20. 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).
21. MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 319p.(1997)
22. NUNES, F.C.; VILLA, F.; PIO, L.A.S.; RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M. Efeito de nitrato de cálcio e cloreto de potássio na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de ‘Kobber’ In: Congresso brasileiro de olericultura, 45., Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 15., Congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 2., Fortaleza, *Anais...* Fortaleza, Sociedade Brasileira de Olericultura, p. 626.(2005)
23. FIQUEIREDO, A.M.; PASQUAL, M; ARAUJO, G.A.; JUNQUEIRA, P.K.; SANTOS, C.F.; RODRIGUES, A.V. Fontes de Potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya Loddigesii*. *Ciência Rural*, v. 3, p. 255-257. (2008).
24. PASQUAL, M. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – meios de cultura*. Lavras: UFLA/FAEPE. 74p.(2001)
25. 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).