

## CULTIVO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA EM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

### *IN VITRO* CULTURE OF ORCHID'S SEEDLINGS IN AN ALTERNATIVE CULTURE MEDIUM

Maria Helena Herrmann<sup>1,2\*</sup>; Elisete Maria de Freitas<sup>2,3</sup>; Eduardo Périco<sup>2,4</sup>.

- NOTA TÉCNICA -

#### RESUMO

A micropropagação *in vitro* de orquídeas a partir de sementes é uma alternativa viável para a obtenção de mudas em condições controladas, visando o abastecimento do mercado e a preservação de espécies ameaçadas de extinção. Os meios de cultura tradicionais são complexos e de custos elevados, dificultando o acesso aos pequenos produtores. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um meio de cultura alternativo no desenvolvimento de plântulas de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae), comparando-o com meios tradicionais. As sementes de *B. tuberculata* foram submetidas a três tratamentos: T1 (meio Murashige & Skoog); T2 (meio Knudson C); T3 (meio alternativo). Foram retiradas 30 plântulas em cada tratamento para pesagem de massa fresca aos 145, 175 e 235 dias após a semeadura. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey. Em T1 as plântulas apresentaram crescimento menor nas três pesagens e, em T3, maior crescimento. A maior diferença entre os meios foi observada na terceira pesagem ( $p < 0,05$ ) entre (T1 e T2) e ( $p < 0,01$ ) entre (T1 e T3) e (T2 e T3). O meio de cultura alternativo (T3) promoveu o melhor desenvolvimento de plântulas de *B. tuberculata*.

**Palavras-chave:** Orchidaceae; *Brassavola tuberculata*; micropropagação; preservação; alternativa de cultivo.

#### ABSTRACT

The orchid's *in vitro* micropropagation from seeds is a viable alternative for obtaining seedlings in

controlled conditions, aiming to market supply and preservation of endangered species. The culture mediums traditionally used are complex and expensive, difficulting the access by small producers. This study aimed to evaluate the efficiency of an alternative culture medium to the seedlings development of *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae), comparing with traditional mediums. The seeds of *B. tuberculata* were subjected to three treatments: T1 (medium Murashige & Skoog), T2 (medium Knudson C); T3 (alternative medium). A total of 30 seedlings were removed in each treatment and the fresh mass weighted at intervals of 145, 175 and 235 days after sowing. The data were submitted to the analysis of variance and Tukey test. In T1 the seedlings showed lower growth in the three weightings and, in T3, higher growth. The greater difference among the mediums was observed in the third weighting ( $p < 0.05$ ) between (T1 and T2) and ( $p < 0.01$ ) between (T1 and T3) and (T2 and T3). The alternative culture medium (T3) promoted the best development of seedlings of *B. tuberculata*.

**Key words:** Orchidaceae; *Brassavola tuberculata*; micropropagation; preservation; alternative cultivate.

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas em número de espécies, incluindo cerca de 850 gêneros e 20.000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005), representando um importante componente da biodiversidade, com destaque para as espécies epífitas, perfazendo cerca de 73% do total das espécies da família (ATWOOD, 1986).

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor

<sup>1\*</sup>Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES.

<sup>2</sup>Museu de Ciências Naturais do Centro Universitário UNIVATES.

<sup>3</sup>Mestre em Botânica (UFRGS) e Coordenadora do Museu de Ciências Naturais do Centro Universitário UNIVATES

<sup>4</sup>Doutor em Ecologia (USP), Professor do Curso de Graduação em Ciências Biológicas e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento - UNIVATES

\* Rua Otelo Rosa, 249. São Cristóvão. Lajeado – RS. CEP: 95.900-000. E-mail: [maria.helena.herrmann@gmail.com](mailto:maria.helena.herrmann@gmail.com).

(Recebido para Publicação em 23/06/2009, Aprovado em 04/07/2010)

comercial, sendo identificadas mais de 3.500 espécies no Brasil, porém, muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seus *habitats* e às coletas predatórias (COLOMBO et al., 2004).

*Brassavola tuberculata* Hook é uma espécie epifítica, nativa no Rio Grande do Sul, com ocorrência bastante abrangente. É encontrada na Planície Costeira, Depressão Central, Planalto Sul-Rio-Grandense e Planalto das Missões (NUNES & WAECHTER, 1998).

Em condições naturais, as sementes de orquídeas germinam através de uma associação com fungos micorrízicos, os quais fornecem os nutrientes necessários (RASMUSSEN, 2002). Na cultura *in vitro* obtêm-se maiores percentuais de germinação quando comparada com as condições naturais. Assim, a micropropagação constitui uma técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico (Martini et al., 2001). O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas livres de doenças e pragas, além de propiciar a produção de um número significativo de novas mudas uniformes (FIGUEIREDO et al., 2007).

A formulação do meio de cultura é essencial para a planta, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com os requerimentos de cada espécie (FARIA et al., 2002). Existem vários meios utilizados para os trabalhos de cultivo *in vitro* de orquídeas. Em geral, a composição é complexa, contendo diversos macro e micronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, elevando os custos na propagação *in vitro* das espécies (VENTURA, 2002). O meio de cultura Knudson C (KNUDSON, 1946) é o mais utilizado para a sementeira, apresenta baixo conteúdo de sais, com aproximadamente  $\frac{1}{4}$  da concentração de íons de nitrato e amônio do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), que, por sua vez, é conhecido como um meio com alto conteúdo de sais (RIBEIRO et al., 2002).

Os meios de cultura poderiam ter seu custo reduzido pela simplificação dos mesmos (STANCATO et al., 2001). Uma maneira é produzir um meio de cultura através da utilização de um adubo químico composto por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) e produtos orgânicos como tomate, banana e água de coco. Estes componentes podem substituir os elementos químicos indicados nas tradicionais composições usadas universalmente para micropropagação de orquídeas, não sendo necessário realizar as complicadas pesagens dos nutrientes (CAMPOS, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um meio de cultura alternativo no desenvolvimento inicial de plântulas de *B. tuberculata*, comparando-o com meios de cultura tradicionais, visando à obtenção de plantas de qualidade em um meio de cultura de baixo custo e de fácil aplicação

para pequenos produtores, viabilizando o cultivo de orquídeas por estes.

O experimento foi realizado no período de março a novembro de 2007, no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Centro Universitário UNIVATES, campus Lajeado, Rio Grande do Sul.

Para a sementeira, foram utilizadas sementes de *Brassavola tuberculata* Hook obtidas através de polinização artificial realizada em plantas mantidas no acervo vivo do Jardim Botânico de Lajeado. Após o amadurecimento dos frutos, as cápsulas foram coletadas e todo o procedimento da sementeira foi realizado em capela de fluxo laminar, desinfestada com álcool 70% (etanol). Para a desinfestação, as sementes foram acondicionadas em placas de Petri e submetidas a vapores de formol por duas horas (ALVAREZ-PARDO, et al., 2006). Pinças e demais materiais utilizados nos procedimentos de sementeira, foram mantidos em um pote fechado com pastilhas de formol. Todo o material, antes de ser introduzido na capela, foi pulverizado com álcool 70%. Após a sementeira em frascos de vidro (200 ml) com tampa plástica autoclavável, foi realizada a vedação dos mesmos com filme de PVC. Em seguida, os frascos foram identificados e mantidos em sala de crescimento com luminosidade de 1.000 lux, fotoperíodo de 16 horas luz/dia e temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

As sementes de *B. tuberculata* foram inoculadas *in vitro* em março de 2007 e submetidas a três tratamentos, denominados T1, T2 e T3. T1 correspondeu ao meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado, contendo metade da concentração dos macronutrientes,  $20 \text{ g L}^{-1}$  de açúcar comercial,  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de caseína; T2 correspondeu ao meio de cultura Knudson C (KNUDSON, 1946), com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de açúcar comercial,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e adição de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado; T3 correspondeu ao meio de cultura alternativo (CAMPOS, 2002).

Para o preparo de um litro do meio alternativo foram utilizados 3 mL de adubo comercial de formulação NPK (7-9-5), 5 tomates cereja, 200 mL de água de coco, 40 g de banana caturra, 2 g de carvão ativado, 6 g de açúcar comercial, 7 g de ágar e água destilada para completar um litro. Para o preparo os componentes foram homogeneizados no liquidificador.

O pH dos três tratamentos foi ajustado para  $5,2 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar, do açúcar e da caseína (para o meio MS). Em seguida, os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro até atingirem cerca de 30 mL e posteriormente, esterilizados em autoclave à pressão de 1,1 atm e à temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Para avaliar a eficiência dos meios de cultura no desenvolvimento inicial das plântulas de *B. tuberculata*, eram retiradas 30 plântulas de cada tratamento e realizadas três pesagens de massa fresca em balança de precisão. Após a pesagem as plântulas eram eliminadas. A primeira pesagem foi

realizada 145 dias após a semeadura, seguida de um intervalo de 30 dias (totalizando 175 dias) para a segunda e de 60 dias (totalizando 235 dias) para a terceira. As plântulas (repetições) foram retiradas de cada um dos frascos, no interior da capela de fluxo laminar, seguindo os procedimentos descritos anteriormente para desinfestação do local. Após a retirada das plântulas, os frascos eram novamente vedados e transferidos para a sala de crescimento. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância e ao teste de Tukey.

As plântulas submetidas ao tratamento T1 (meio MS modificado) apresentaram crescimento menor nas três séries de pesagem do que as submetidas aos demais tratamentos. Com o meio T2 (Knudson C), as pesagens não indicaram crescimento

homogêneo das plântulas, enquanto que em T3 (meio alternativo), percebeu-se crescimento progressivo das plântulas nas três pesagens e elevado incremento de massa, em especial na segunda e terceira pesagens.

A análise de variância apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para as três pesagens. Na primeira pesagem ( $F = 32,70$ ;  $p < 0,0001$ ), o teste de Tukey indicou diferenças significativas entre T1 e T2 ( $p < 0,01$ ) e T1 e T3 ( $p < 0,01$ ) (Fig. 1); na segunda pesagem ( $F = 18,87$ ;  $p < 0,0001$ ) foram observadas diferenças significativas entre T1 e T3 ( $p < 0,01$ ) e T2 e T3 ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2) e, na terceira pesagem ( $F = 43,16$ ;  $p < 0,0001$ ) foram observadas diferenças significativas entre T1 e T2 ( $p < 0,05$ ) e T1 e T3 ( $p < 0,01$ ) e T2 e T3 ( $p < 0,01$ ) (Fig. 3).

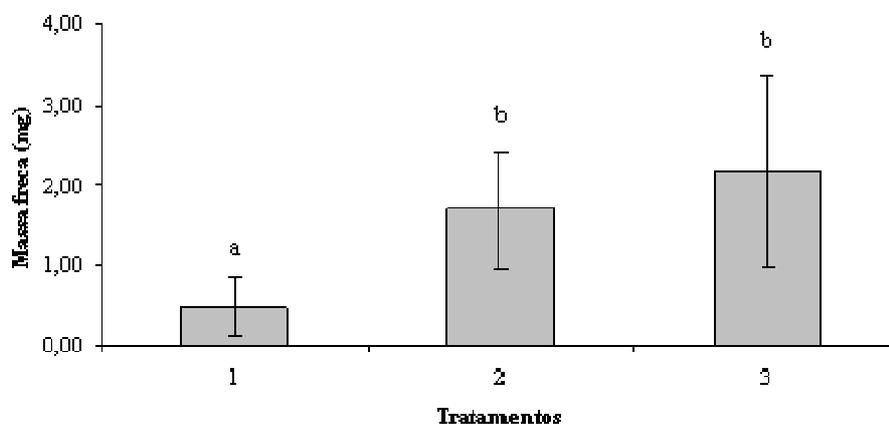


Figura 1. Média e desvio padrão da massa fresca das plântulas de *Brassavola tuberculata* Hook, após 145 dias de cultivo. 1 = meio Murashige & Skooge); 2 = meio Knudson C; 3= meio alternativo. Colunas com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, com probabilidade de erro de 1%.  $n = 30$  repetições para cada meio.

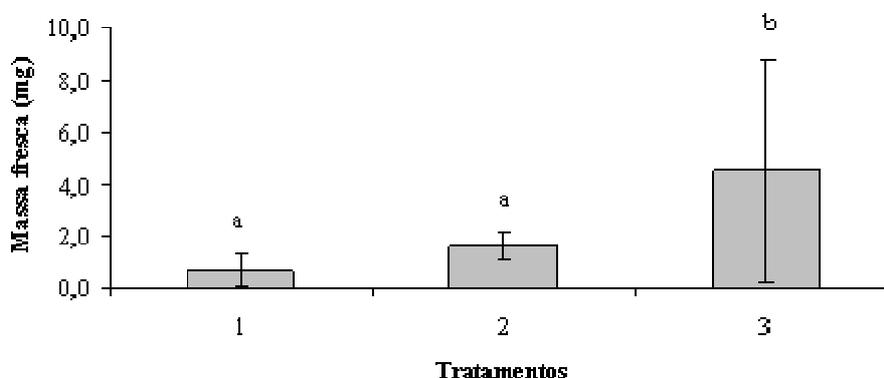


Figura 2. Média e desvio padrão da massa fresca das plântulas de *Brassavola tuberculata* Hook, após 175 dias de cultivo. 1 = meio Murashige & Skooge); 2 = meio Knudson C; 3= meio alternativo. Colunas com a mesma letra, não

diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, com probabilidade de erro de 1%. n = 30 repetições para cada meio.

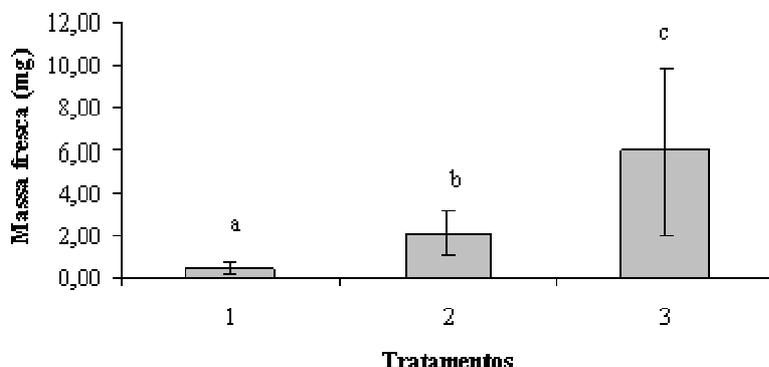


Figura 3. Média e desvio padrão da massa fresca das plântulas de *Brassavola tuberculata*, após 235 dias de cultivo. 1 = meio Murashige & Skoog; 2 = meio Knudson C; 3= meio alternativo. Colunas com as letras “a” e “b” diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, com probabilidade de erro de 5% e colunas com as letras “a” e “c” e “b” e “c” diferem estatisticamente entre si com probabilidade de erro de 1%. n = 30 repetições para cada meio.

O meio alternativo (T3) que utiliza componentes de fácil acesso e de baixo custo apresentou resultados superiores aos meios Murashige & Skoog (T1) e Knudson C (T2). Este meio de cultura alternativo não utiliza compostos cuja compra é controlada pelo Ministério de Defesa, como nitrato de amônia e nitrato de potássio, utilizados no meio de cultura MS. Este controle é regulamentado pela Lei Federal nº 3665 de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000).

O meio de cultura alternativo testado para *B. tuberculata* contém banana, NPK e carvão ativado. Esses componentes, testados por outros pesquisadores no cultivo *in vitro* de orquídeas, demonstraram ser eficientes para o desenvolvimento de plântulas de algumas espécies de orquídeas *in vitro*.

SANTOS et al. (2006) ao realizarem experimentos *in vitro* de *Sophronis coccinea* (Lindl.) Rchb.f. em diferentes meios acrescidos ou não de carvão ativado, constataram que em todos os meios contendo carvão houve maior incremento de massa fresca total.

SILVA (2003) também obteve melhores resultados na propagação *in vitro* de *Cattleya tigrina* A.Rich., utilizando um meio de cultura com fertilizante comercial Dyna-Gro® 7-9-5, tomate e água de coco, comparando-o com o meio MS.

Analisando a altura da parte aérea da plântula de *Oncidium nanum* Lindl., UNEMOTO et al. (2007), obtiveram melhores resultados com a utilização de meio de cultura com adubo comercial na concentração

NPK (6-6-8) em relação ao meio MS com metade dos macronutrientes, acrescido de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e com pH ajustado em 5,7.

STANCATO et al. (2008) estudaram o efeito das polpas de frutas no crescimento de plântulas de orquídeas *in vitro*. Para isso, submeteram sementes de *Miltonia spectabilis* Lindl., *Laelia longipes* Rchb.f. e *Laelia tenebrosa* (Rolfe) Rolfe a diferentes tratamentos: a) NPK (nas concentrações 10-10-10 e 10-30-20), b) polpa de maçã, c) polpa de tomate, d) polpa de banana, e) Knudson, f) Vacin e Went (V&W) e g) MS. *M. spectabilis* apresentou maior acúmulo de massa seca no meio com NPK (10-30-20) e em polpa de banana. Já *L. longipes* apresentou maior acúmulo de massa seca quando cultivada em meio NPK (10-10-10) e em polpa de banana. *L. tenebrosa* apresentou melhor acúmulo de matéria seca quando cultivada em meio de polpa de banana. As três espécies apresentaram menor acúmulo de massa seca quando cultivadas no meio MS, conferindo com os resultados obtidos no experimento com *B. tuberculata*.

O experimento com diferentes meios de cultura para a micropropagação *in vitro* de *B. tuberculata* indicou que o meio de cultura alternativo, produzido com adubo comercial e produtos orgânicos, foi o mais eficiente no desenvolvimento inicial das plântulas desta espécie de orquídea, atendendo ao objetivo do trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G.; NUNES, V.F. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.24, n.9, p. 217-220, 2006.

ATWOOD, J.T. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of the epiphytic orchids. **Selbyana**, Beltsville, v.9, p.171-186, 1986.

BRASIL. **Decreto Nº 3665 de 20 de novembro de 2000. Dá nova redação ao Regulamento para a Fiscalização de Produtos Controlados (R-105).** Disponível em: [http://www.5csm.eb.mil.br/5CSM\\_Internet/sfpc/r105.htm](http://www.5csm.eb.mil.br/5CSM_Internet/sfpc/r105.htm). Acesso em: 28 ago. 2008.

CAMPOS, D.M. de. **Orquídeas: manual prático de cultura.** Expressão e Cultura: Rio de Janeiro, 2002. 143p.

COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M.; FONSECA, I.C.B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n.2, p.253-258, 2004.

FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; ALBINO, U.B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.2, n.3, p.489-492, 2002.

FIGUEIREDO, M.A.de; SANTOS, F.M. dos; COSTA E SILVA, J.O.; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M. Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento *in vitro* em Híbridos de Orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.294-296, 2007.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1319-1324, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Scandinávia, v.15, p.495-497, 1962.

NUNES, V.F.; WAECHTER, J.L. Florística e aspectos fitogeográficos de Orchidaceae epifíticas de um morro granítico subtropical. **Pesquisas Botânicas**, São Leopoldo, v.48, p.127-191, 1998.

RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant soil**, Netherlands, v.244, p.149-163, 2002.

RIBEIRO, L.S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; CHAGAS, E.A.; DUTRA, L.F. Multiplicação *in vitro* de brotações de várias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.26, n.5, p.949-954, 2002.

SANTOS, A.F.; VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; GOULART, M.S.; NOVAIS, R.F., CECON, P.R.; TEIXEIRA, S.L.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 46. **Anais**. Goiânia. 2006.

SILVA, A.L.L. Avaliação de uma receita para o cultivo de orquídeas *in vitro*. **Orquidário**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 28-30, 2003.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

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**, Campinas, v.17, n.1., p.25-33, 2001.

STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. Crescimento de orquídeas epifíticas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.51-57, 2008.

VENTURA, G.M. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*.** Viçosa, 2002. 147p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.2, p.267-269, 2007.