

**PROPAGACÃO *IN VITRO* DE *Cattleya bowringiana* O'BRIEN
EM DIFERENTES DENSIDADES DE CULTIVO**

FIGUEIREDO, Deleon Demoner Caulyt¹
PALAORO, Geferson Junior¹
NASCIMENTO, Adriel Lima²
FERREIRA, Jeferson Pereira²
SCHMILDT, Omar³
SCHMILDT, Edilson Romais⁴

Recebido em: 2017.06.14

Aprovado em: 2018.09.05

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.2791

RESUMO: O cultivo *in vitro* de orquídeas via sementes constitui uma opção importante de propagação para aumentar a germinação das sementes, e perpetuação de espécies em extinção. O presente trabalho teve por objetivo estudar o crescimento das plântulas de orquídeas *Cattleya bowringiana* O'brien *in vitro* em diferentes densidades de cultivo. Plântulas de *C. bowringiana* de 1,0 cm de comprimento, provenientes da sementeira *in vitro* foram cultivadas em meio de cultura MS, tendo como tratamentos, diferentes densidades de cultivo (5; 10; 15; 20 e 25 plântulas/frasco), com 5 repetições. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão. Na análise de massa fresca, número de raízes, comprimento da maior raiz e da parte aérea, por plântula, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. O maior número de brotos alcançado por plântulas foi com a utilização de 15 plântulas/frasco, sendo, portanto, esta a melhor densidade de cultivo.

Palavras-chave: Orquídea. Cultivo *in vitro*. Meio MS.

***IN VITRO* PROPAGATION OF *Cattleya bowringiana* O'BRIEN
IN DIFFERENT CULTIVATION DENSITIES**

SUMMARY: The *in vitro* cultivation of orchids via seeds is an important propagation option to increase seed germination, and the perpetuation of endangered species. The objective of the present work was to study the growth of the orchid seedlings *Cattleya bowringiana* O'brien *in vitro* at different growing densities. Seedlings of 1.0 cm long *C. bowringiana* from *in vitro* seeding were grown in MS culture medium, with different culture densities (5; 10; 15, 20 and 25 seedlings/bottle) as treatments in 5 repetitions. The experimental design was completely randomized. Data were submitted to analysis of variance and regression. In the analysis of fresh mass, number of roots, length of the largest root and shoot, per seedling, there were no statistical differences between the treatments. The highest number of shoots reached by seedlings was with the use of 15 seedlings/bottle, being therefore the best density cultivation.

Keywords: Orchid. *In vitro* culture. MS medium.

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, porém, muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seu habitat e às coletas predatórias (COLOMBO et al., 2004).

¹ Dep. de Ciências Agrárias e Biológicas / Cultura de Tecidos Vegetais - CEUNES/UFES

² Dep. de Ciências Agrárias e Biológicas / Melhoramento Vegetal - CEUNES/UFES

³ Dep. de Ciências Agrárias e Biológicas / Cultura de Tecidos Vegetais / Propagação de Plantas - CEUNES/UFES

⁴ Dep. de Ciências Agrárias e Biológicas / Melhoramento Vegetal / Cultura de Tecidos Vegetais - CEUNES/UFES

Na natureza, a germinação de sementes de orquídeas ocorre somente na presença de fungos específicos, e estima-se que apenas aproximadamente 5% das sementes dessas plantas possam germinar em condições naturais (ARDITTI, 1979). Como forma de propagação, o cultivo *in vitro* se destaca como uma técnica que viabiliza a germinação de sementes, possibilitando a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo e com qualidade fitossanitária (PASQUAL et al., 2011; FARIA et al., 2012).

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 (CAMPOS, 1996).

Um fator relevante na redução de custos para produção de mudas *in vitro* é a utilização do volume adequado de meio de cultivo e bem como ótimo número de plântulas por frasco que, conseqüentemente, irão favorecer a diminuição dos custos finais (SOARES et al., 2008). Sendo assim, este trabalho buscou estudar o crescimento das plântulas de orquídeas *Cattleya bowringiana* O'Brien *in vitro* em cinco diferentes densidades de cultivo.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUNES/UFES), em São Mateus-ES, no período de maio a setembro de 2014.

Cápsulas com sementes maduras de *Cattleya bowringiana* O'Brien foram obtidas por autopolinização artificial, após seis meses de cultivo em casa de vegetação. Essas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar horizontal, com álcool 70%, por 5 minutos, seguida de solução de hipoclorito de sódio 4%, por 15 minutos, e enxaguadas por três vezes consecutivas com água destilada e autoclavada. As sementes foram extraídas das cápsulas com o auxílio de pinça e semeadas, um dia após o preparo do meio, em frascos de 250 mL, contendo 35 mL de meio MS completo (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com Agar a 7,0 g.L⁻¹, com pH ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C e 1,05 atm por 20 minutos.

Na sala de cultura os frascos de cultivo foram mantidos sob lâmpadas fluorescentes com 25,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxos de fótons fotossintéticos, temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. Transcorrido seis meses da semeadura, foram selecionadas para o experimento as plântulas que apresentavam comprimento de 1,0 cm, sendo os procedimentos do preparo do meio de cultura e as condições de ambiente do recultivo, as mesmas adotadas na fase de semeadura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (5; 10; 15; 20 e 25 plântulas/frasco) e 5 repetições. Cada frasco representou uma parcela

Ao final de seis meses do recultivo, procedeu-se as avaliações. Nessa ocasião avaliou-se o comprimento da parte aérea comprimento da maior raiz, utilizando-se de paquímetro digital (Digimess 100A), o número de brotos e de raízes, e a massa fresca de cada plântula utilizando balança analítica Gehaka BG 400.

Os dados das variáveis foram processados com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2013) utilizando-se a análise de variância, e posterior análise de regressão.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Pela análise de variância (Tabela 1), observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para o número de brotos/plântula (NBP).

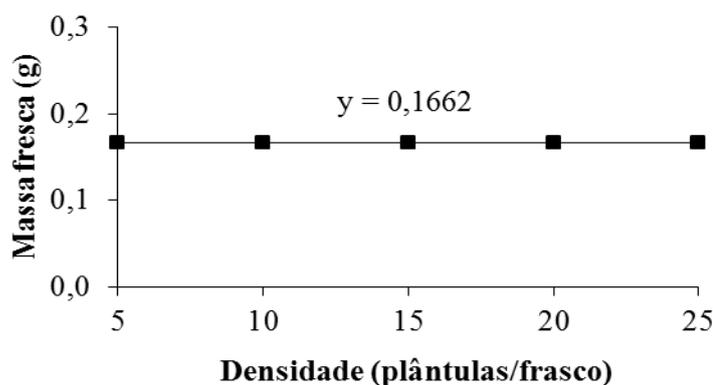
Tabela 1 – Resumo da análise de variância da massa fresca por plântula (MFP), comprimento de parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR), número de brotos por plântula (NBP) e raízes por plântula (NRP) de *Cattleya bowringiana* O'Brien cultivadas em diferentes densidades de plântulas *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CEUNES/UFES, em 2014

Características	Quadrado Médio		Média	CV(%)
	Resíduo	Tratamento		
MFP (g)	0,0035	0,0051 ^{ns}	0,17	35,30
CPA (cm)	0,1262	0,0677 ^{ns}	1,47	24,03
CMR (cm)	1,2019	0,7229 ^{ns}	3,64	29,72
NBP (n°)	0,6078	2,7816 ^{**}	2,15	36,29
NRP (n°)	1,5554	1,8050 ^{ns}	4,17	30,74

^{ns}, não significativo a 5 % pelo teste de F; ^{**} significativo a 1 % pelo teste de F.

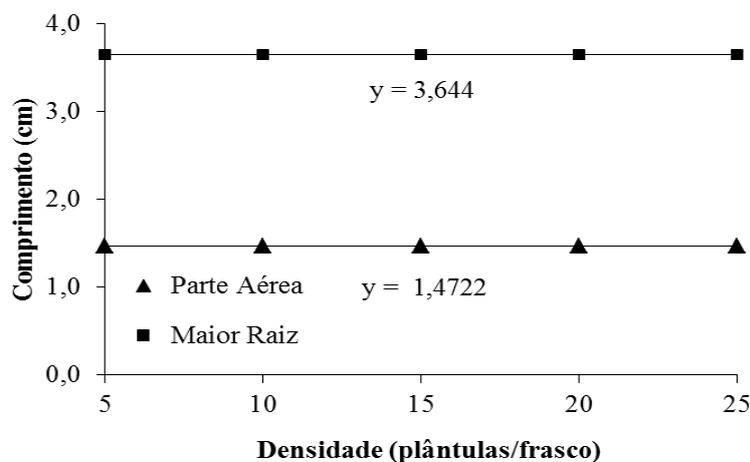
Em relação à massa fresca por plântula (MFP), não houve diferenças entre as densidades de semeadura, com média em torno de 0,17 g/plântula (Figura 1). Há vários relatos na literatura de trabalhos que buscam redução no custo da muda produzida *in vitro* (SOARES et al., 2008; FERREIRA et al., 2012; SOARES et al. 2013a; SOARES et al., 2013,b). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que se pode ter economia no processo produtivo usando-se maior densidade de cultivo, no caso, até 20 plântulas ao invés de 5 plântulas por frasco contendo 35 mL de meio de cultivo.

Figura 1 – Massa fresca por plântula de *Cattleya bowringiana* O'Brien cultivadas em diferentes densidades de plântulas *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CEUNES/UFES, em 2014.



O comprimento médio da maior raiz (CMR) das plântulas foi de 3,6 cm, para densidades desde 5 até 25 plântulas por frasco (Figura 2). Estes resultados são importantes, mostrando que mesmo em alta densidade de cultivo as raízes das plântulas não deixaram de crescer, semelhante ao verificado por Moraes et al (2009) no cultivo de *Cattleya loddigesii* Lindley em meio MS com densidade maior de 50 plântulas por frasco.

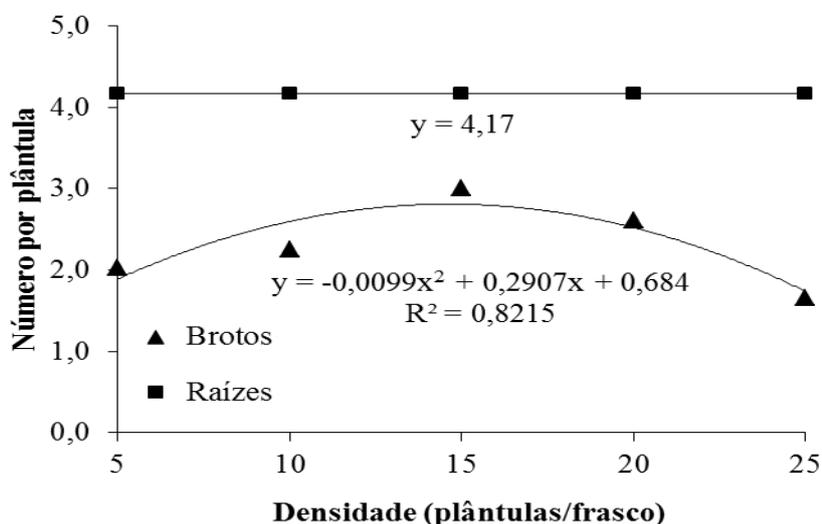
Figura 2 – Comprimento de parte aérea e da maior raiz de *Cattleya bowringiana* O’Brien, cultivadas em diferentes densidades de plântulas *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CEUNES/UFES, em 2014.



Na análise do comprimento da parte aérea (CPA), verifica-se que a média foi de 1,47 cm, independente da densidade (Figura 2). Soares et al. (2008), também verificaram resultados semelhantes com plântulas de orquídeas *C. loddigesii*, no entanto, para a *C. percivaliana*, os autores obtiveram com a utilização de 3 explantes/frasco o maior comprimento de parte aérea das plântulas (1,8 cm), embora o tratamento com 12 explantes/frasco (1,66 cm) tenha diferido estatisticamente no CPA, essa diferença pode ser considerada pequena em níveis práticos, indicando-se assim utilizar maior quantidade de explantes/frasco para economizar nos custos. George, Hall e De Klerk (2008) enfatizam que a densidade de cultivo varia em função do genótipo.

Analisando a Figura 3, verifica-se que o número de brotos/plântula (NBP), teve uma resposta quadrática, com o máximo de 2,7 brotos/explante na densidade de 15 plântulas/frasco. Beraud e Ulloa (2015) encontraram resultados semelhantes em *Vaccinium corymbosum* L, com a redução de número de brotos por plântula (2,3) com a utilização de 20 e 25 plântulas por frasco, e explicam que a maior quantidade de plântulas provoca um maior sombreamento e, portanto, maior dominância apical.

Figura 3 – Número de brotos e de raízes de *Cattleya bowringiana* O’Brien cultivadas em diferentes densidades de plântulas *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CEUNES/UFES, em 2014.



Não houve diferença estatística significativa para número de raízes por plântula (NRP) em função da densidade de plântulas por frasco (Figura 3), com média de 4,17 raízes. Estes resultados são importantes para maior utilização de densidade de cultivo, visto que a maior quantidade de raízes nas plântulas é essencial e deve ser estimulada para maior sobrevivência durante a aclimatização de orquídeas (SORACE et al., 2007). Diferentemente dos resultados encontrados, Soares et al. (2008) trabalhando com *C. loddigesii*, obtiveram diferenças significativas na quantidade de plântulas por frasco, obtendo-se maior número de raízes (6,30) com a utilização de 75 mL de meio nutritivo em apenas 3 plântulas/frasco. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a variabilidade na resposta morfogênética *in vitro*, que existe não apenas entre espécies, mas também dentro de cada genótipo, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados.

CONCLUSÃO

Para o crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas da espécie *C. bowringiana* O'Brien, indica-se 15 plântulas/frasco de 250 mL contendo 35 mL de meio MS.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. In: WOOLHOUSE, H. (Ed.) **Advances in Botanical Research**, London: Academic Press, 1979, v.7, p.421-655.
- BERAUD, M. R.; ULLOA, D. M. Efecto de ladensidad de explantes y elvolumen de medio decultivo sobre La multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. **ScientiaAgropecuaria**, v.6, n.1, p.31-40, 2015. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>
- CAMPOS, D. M. **Orquídea: manual prático de cultura**. São Paulo: Correa, 1996. 143p.
- COLOMBO, L. A. et al. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, v.26, n.2, p.253-258, 2004. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v26i2.1893>
- CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.35, n.3, p.271-276, 2013. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
- FARIA, R. T. et al. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Macenas, 2012. 116p.
- FERREIRA, J. P. et al. Crescimento *in vitro* de orquídea em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio. **Nucleus**, v.9, n.1, p.137-141, 2012. <http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278.693>
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture 3rd edition**: v. 1. the background. Dordrecht: Springer, 2008. p.65-113.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

MORAES, C. P. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, n.1, p.67-69, 2009.

<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1134>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PASQUAL M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**. v.29, n.3, p.324-329, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000300011>

SOARES, J. D. R. et al. Concentrações de silício e GA₃ na propagação *in vitro* de orquídea em condição de luz natural. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 4, p.286-292, 2013a.

<http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v12n4p286-292>

SOARES, J. D. R. et al. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes.

Revista Ceres, v. 55, n. 1, p. 49-53, 2008. <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3288>

SOARES, J. S. et al. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p.63-67, 2013b.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000100010>

SORACE, M. et al. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina**, v.28, n.2, p.195- 200, 2007. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n2p195>