

FERNANDO CEZAR BETTÃO

EFEITO DE VARIEDADES E CONCENTRAÇÕES DE POLPA DE BANANA
NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya walkeriana* Gardner
(ORCHIDACEAE)

MÁRINGA
PARANÁ – BRASIL
JUNHO – 2009

FERNANDO CEZAR BETTÃO

EFEITO DE VARIEDADES E CONCENTRAÇÕES DE POLPA DE BANANA
NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya walkeriana* Gardner
(ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, para obtenção do título de mestre.

MÁRINGA
PARANÁ – BRASIL
JUNHO – 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B565e Bettão, Fernando Cezar
Efeito de variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae) / Fernando Cezar Bettão. -- Maringá, 2009.
35 f. : il. color.

Orientadora : Prof. Dr. Maria de Fatima Pires da Silva Machado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Agronomia, 2009.

1. Orquídea (*Cattleya walkeriana* Gardner) - Cultivo assimiótico. 2. Orquídea (*Cattleya walkeriana* Gardner) - Suplemento indeterminado - Banana. 3. Orquídea (*Cattleya walkeriana* Gardner) - Plantas ornamentais. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Agronomia. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que sempre esteve do meu lado dando -me muita calma e perseverança, principalmente nos momentos de nervosismo e ansiedade;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, que ajudou muito na execução e conclusão deste trabalho, tendo uma enorme paciência comigo durante a orientação;

A Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez, pela oportunidade de trabalho, e disponibilidade dos laboratórios, materiais para a produção desse trabalho, e por tantos outros;

À minha família pela compreensão e auxílio, sempre ajudando -me no que estava ao alcance deles;

A todos os amigos que sempre me incentivaram a executar este Mestrado, em especial, Edison e Allana que nunca me deixaram desistir;

A todos amigos do Mestrado, em especial à meu amigo Guilherme, e à Letícia, por estar sempre comigo, sempre me dando apoio e ajuda durante a época do mestrado; também a Mariana e tantos outros que me ajudaram no decorrer desta batalha;

A Secretaria do curso, em especial a Érica, que sempre me ajudou em que precisei.

BIOGRAFIA

FERNANDO CEZAR BETTÃO nasceu em 21 de setembro de 1982, na cidade de Cianorte – PR.

Graduou-se em Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia na Universidade Paranaense (UNIPAR), CAMPUS Cianorte – PR, em 2004. No ano de 2007 iniciou a Pós – graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LIERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4.1. Efeito da adição de concentrações de polpa de bana na para o desenvolvimento de raízes e de folhas em plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i>	12
4.2. Alterações de pH do meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de polpa de banana, após 6 meses de cultivo das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i>	24
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Cattleya walkeriana</i>	8
Figura 2. Plântulas de <i>C. walkeriana</i>	8
Figura 3A. Culturas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC 12; 13; 17	
Figura 3B. Culturas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 80 g·L ⁻¹	12
Figura 4. Culturas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 120 g·L ⁻¹	13
Figura 5. Culturas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 160 g·L ⁻¹	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de açúcares totais, fósforo, sódio, cálcio, e potássio, acrescidos ao meio nutritivo pela a adição das diferentes concentrações (20 – 160 g· L ⁻¹) da polpa de banana maçã (BM), banana nanica (BN), e banana prata (BP).....	10
Tabela 2: Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC suplementados com 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 g de polpa de 3 tipos de bananas (maça, nanica, e prata) e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.....	14
Tabela 3: Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC contendo diversas concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, e 160 g) de polpa de banana (maçã, nanica, prata), e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.....	15
Tabela 4: Análise de variância para as características NB (número de brotos) formados em plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC suplementados com 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 g de polpa de 3 tipos de bananas (maça, nanica, e prata) e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.....	16
Tabela 5 Teste de média para as variáveis NB (número de brotos) formados em plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> , cultivadas em meio KC contendo diversas concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, e 160 g) de polpa de banana (maçã, nanica, prata), e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.....	18
Tabela 6: Análise de variância e teste de médias para as características concentrações de PB (proteína bruta), AT (açúcar total), P (fosfato), Na (sódio), Ca (cálcio), e K (potássio) de polpa de banana maçã, nanica, e prata, usadas para suplementar o meio de KC para o cultivo de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i>	22

RESUMO

BETTÃO, Fernando Cezar, Universidade Estadual de Maringá, Junho, 2009.
Efeito de variedades e concentrações de polpa de banana no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae)
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez.

O mercado de plantas ornamentais encontra-se em crescente expansão, principalmente em relação as orquídeas, por serem plantas de imensa beleza, e com um mercado muito promissor. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer uma formulação adequada de meio de cultura, com base na suplementação com polpa de banana, para o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner. Foram preparados meios de cultura, com base na fórmula nutritiva "C" de Knudson suplementados com 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160g·L⁻¹ de polpa de banana das variedades 'maça', 'nanica' e 'prata'. Após 6 meses de cultivo *in vitro*, a análise das plântulas revelou que a suplementação do meio KC com polpa de banana de qualquer uma das três variedades, estimulou a produção de raízes, com efeito mais pronunciado nas concentrações de 80 e 100g·L⁻¹. As concentrações de 120 e 140g·L⁻¹ estimularam de forma significativa o número e o comprimento das folhas. Nas concentrações maiores de polpa de banana, também foi evidente uma menor variação do pH inicial do meio de cultura. Para promover o desenvolvimento de plântulas de *C. walkeriana* em meio KC usando polpa de banana, a estratégia recomendada é que as plântulas sejam inoculadas inicialmente no meio suplementado com 100g·L⁻¹ de polpa de banana prata ou nanica, e após a formação de novas raízes estas plântulas sejam transferidas para meio KC contendo concentrações iguais a 120g·L⁻¹ de polpa de banana prata.

Palavras-chave: Cultivo assimbiótico, orquídeas, suplemento indeterminado.

ABSTRACT

BETTÃO, Fernando Cezar, Universidade Estadual de Maringá, June, 2009.
Effect of different varieties and concentrations of banana pulp in *in vitro* development of *Cattleya Walkeriana* Gardner (Orchidaceae)
Adviser: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Co-Adviser: Prof^a.
Dr^a. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre.

The ornamental plants market is in current expansion, especially the orchids which are plants of remarkable beauty and have a promising market. In such context, the goal of this study was to establish an adequate culture medium formula, based on banana pulp supplementation, for the *in vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner. The culture media were prepared, based on the nutritional formula "C" Knudson supplemented with 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 and 160 g L⁻¹ banana pulps of the 'maçã', 'nanica' and 'prata' varieties. After 6 months of *in vitro* cultivation, the analysis of the seedlings showed that the supplementation of the KC medium using any of the three banana pulp varieties, had stimulated root formation, having a more outstanding effect in the 80 and 100 g L⁻¹ concentrations. The 120 and 140 g L⁻¹ concentrations have stimulated significantly the number and length of leaves. In Higher concentrations of banana pulp it was shown a lesser variation of the medium initial pH. In order to promote the development of *C. walkeriana* seedlings in KC medium using banana pulp, the recommended strategy is that the seedlings should be initially inoculated in the 100 g L⁻¹ supplemented medium using 'prata' or 'nanica' banana pulp varieties, and after the growth of new roots, these seedlings should be transferred to the 120 g L⁻¹ KC medium of 'prata' banana pulp variety.

Keywords: assymbiotic cultivation, orchids, undetermined supplement

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as fanerógamas, sendo altamente especializada, e a mais evoluída dentre as monocotiledôneas (DRESSLER, 1993); devido à beleza e diversidade de suas flores, as orquídeas sempre atraíram a atenção de colecionadores e pesquisadores, especialmente as espécies e híbridos intragenéricos e intraespecíficos de *Cattleya* e *Laelia*, que são de interesse comercial em razão da beleza, tamanho e durabilidade de suas flores.

O cultivo de espécies e híbridos de orquídeas tem sido realizado desde que se iniciou sua produção comercial, no século XIX, sendo que o primeiro híbrido interespecífico registrado teve como parental uma espécie de *Cattleya*, em 1850. Até o ano de 2001 foram registrados 80.318 híbridos dos gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e *Vanda*, os quais constituem os componentes mais importantes do comércio internacional de orquídeas conforme enfatizado em Convención (2002).

Segundo Soncin *et al.* (2009), as exportações brasileiras de flores chegaram a 25 milhões de dólares em 2004, com crescimento anual de 25%. Atualmente, a floricultura paulista ocupa cerca de 60% do mercado nacional, movimentando valores em torno de US\$ 900 milhões no varejo. As orquídeas ainda compõem uma pequena parte desse contexto, porém com crescimento econômico anual de mais de 100%. Em adição, segundo o mesmo autor, o Brasil possui notórias vantagens comparativas para especializar-se na produção de flores, devido aos microclimas privilegiados, a disponibilidade de terrenos, água, mão-de-obra, tecnologias agrônômicas, infra-estrutura aeroportuária e canais de distribuição adequados. Estes fatores incidem diretamente na qualidade do produto, ao mesmo tempo em que permitem um adequado e racional manejo dos custos, oferecendo preços competitivos nos mercados externos.

Uma das singularidades da família Orchidaceae é a produção de milhares de pequenas sementes em cada fruto (DRESSLER, 1993), e o processo de germinação, na natureza, ocorre depois de instalada uma simbiose com fungos micorrízicos, em troncos e ramos de árvores (epífitas),

sobre rochas (rupículas), no solo (terrestres), advindo do microrganismo os produtos necessários para o desenvolvimento dos embriões (PAULA e SILVA, 2002).

Nas espécies de orquídeas tropicais, consideradas por Yam e Weatherhead (1988) como fáceis de germinar *in vitro*, os métodos de germinação simbiótica foram substituídos pelo procedimento de germinação não-simbiótica, após Lewis Knudson (1922), relatar que o fungo não era necessário para a germinação das sementes de orquídeas, caso fossem semeadas sobre meio de cultura que contém ágar, sais apropriados e uma fonte de carboidratos. Assim, com a tecnologia da germinação assimbiótica, milhares de plântulas podem chegar à maturidade a partir de um único fruto. Das várias fórmulas nutritivas propostas por Knudson, a mais conhecida é a fórmula C (KNUDSON, 1946), sendo este um dos meios mais utilizados para a maioria das espécies de orquídeas epífitas.

De acordo com Convención (2002), dentre as milhares de orquídeas comercializadas anualmente, 95% destas são propagadas *in vitro*, diminuindo o número de plantas coletadas em seu ambiente natural. Atualmente, a cultura assimbiótica, ou semeadura *in vitro*, constitui um método da biotecnologia vegetal, relevante do ponto de vista comercial e ecológico, por contribuir com a produção de mudas que serão disponibilizadas ao comércio floriculturista. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos biotecnológicos para incrementar a germinação e o desenvolvimento das plântulas de orquídeas tem sido considerado um investimento prioritário.

Diversos são os aditivos ou suplementos que podem ser adicionados às formulações básicas do meio de cultura para o crescimento *in vitro* das espécies de orquídeas, com os objetivos de aumentar a produtividade, obtendo-se plântulas vigorosas e saudáveis, reduzir o tempo de cultivo e os custos de produção. Como exemplo destes suplementos pode-se citar a água de coco e a polpa de frutos, em especial a polpa de banana nanica. Como a maioria dos aditivos ou suplementos é adicionada aos meios de cultura de forma empírica, existe ainda um déficit de informações sobre seus efeitos sobre os explantes cultivados *in vitro*, em relação a muitas espécies e/ou híbridos de orquídeas nativas brasileiras ou exóticas. Como o mercado de plantas ornamentais é altamente competitivo, as informações relacionadas à

composição dos meios de cultura são pouco disponibilizadas, devido ao interesse econômico das empresas de micropropagação.

A polpa de banana é utilizada nos meios nutritivo por ser de baixo custo e fácil obtenção por parte dos laboratórios comerciais de produção de orquídeas, mas seu efeito não é discutido perante os resultados obtidos. Desta forma, a proposta no presente estudo foi investigar o efeito da adição de polpa de banana, de diferentes variedades e em várias concentrações, ao meio Knudson C, para o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, com o intuito de facilitar a aplicação da técnica e reduzir os custos de produção de mudas de orquídeas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O mercado de flores e plantas ornamentais encontra-se em expansão no Brasil, e dentre as espécies produzidas estão às orquídeas, como destaque para as espécies e híbridos de *Cattleya*. Esse mercado é altamente competitivo, mas informações relacionadas à produção de mudas em larga escala são pouco disponíveis. Quanto as Orchidaceae, uma das características marcantes é o desenvolvimento vegetativo muito lento sob condições naturais; enquanto que o cultivo destas por sementes, *in vitro*, sob condições controladas de laboratório, permite acelerar o processo, mediante a otimização dos fatores relacionados com a nutrição mineral das plântulas.

A adição de suplementos indeterminados às formulações básicas de meios de cultura para produção de orquídeas *in vitro*, tais como a água de coco e polpas de frutos, é um aspecto polêmico do ponto de vista fisiológico, devido à indeterminação de sua composição química perante o grau de maturação, e possibilidade de composição química sazonal dos frutos, devido aos fatores relacionados ao clima e solo da região onde foram cultivados. Além disso, estes suplementos são usados em quantidades e interações aleatórias, mas com evidências de resultados positivos (MORALES, 2004; MORALES *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2006; PRIZÃO *et al.*, 2006), embora a maioria dos estudos não relate sobre a interferência do suplemento indeterminado usados, em relação aos resultados obtidos *in vitro*.

De acordo com as revisões de Arditti (1992) e Caldas *et al.* (1998) os experimentos desenvolvidos *in vitro* têm demonstrado que a polpa de banana é o melhor suplemento para a diferenciação de órgãos e promotor de crescimento de raízes e folhas em plântulas de orquídeas. Arditti *et al.* (1982) recomendam o uso de 90 g·L⁻¹ de polpa de banana variedade “nanica” com cascas amarelas (ainda sem pintas marrons), para o crescimento *in vitro* de diferentes espécies de orquídeas, enquanto que Torres *et al.* (2001) sugerem a possibilidade do uso de frutos verde ou maduro de banana, resultando em diferentes efeitos no crescimento e desenvolvimentos das plântulas cultivadas, com resultados diferenciados para cada espécie e quantidade utilizada.

Segundo Hinnen *et al.* (1989) a polpa de banana pode estimular o crescimento das plântulas de orquídeas *in vitro*, sendo este efeito determinado pelas substâncias existentes em cada variedade de banana, embora os fatores diretamente envolvidos no processo de desenvolvimento vegetal sejam ainda desconhecidos. Além disso, (ARDITTI e ERNST, 1993) confirmaram que a adição da polpa de banana no meio nutritivo aumenta o número de plântulas obtidas a partir dos explantes *in vitro*.

Estes efeitos diferenciados podem ser confirmados nos estudos de Flachsland *et al.* (1996), ao utilizarem 70 g·L⁻¹ de polpa de banana (frutos verdes), para obter maiores porcentagens de germinação das sementes para algumas espécies de orquídeas, enquanto que Yam e Weatherhead (1988), observaram que ocorreu inibição da germinação de várias espécies de orquídeas de Hong Kong, ao utilizar o meio de Knudson suplementado com 100 g·L⁻¹ de polpa de banana, mas este suplemento incrementou o desenvolvimento das plântulas. À semelhança dos estudos acima, Lo *et al.* (2004) indicaram o uso do meio nutritivo MS (MURAS HIGE E SKOOG, 1962) modificado com a adição de polpa de banana, suco de batata ou água de coco para melhor crescimento das plântulas de *Dendrobium*.

Silva (2003), trabalhando com um híbrido secundário de *Brassavola*, *Cattleya* e *Laelia* concluiu que a polpa de banana (100 g·L⁻¹) incrementou o número de brotos adventícios nas plântulas, estando também relacionada com o alongamento das raízes e peso fresco das plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Araujo *et al.* (2006), com plântulas de híbrido de *Cattleya loddgesii* e suplementação do meio nutritivo de Knudson com 100 g·L⁻¹ de polpa de banana, promovendo o crescimento da parte aérea e da raiz e o aumento da massa fresca de raízes; e por Stancato *et al.* (2008), com *Laellia longipes*, *Miltonia spectabilis* e *Laelia tenebrosa*, utilizando 50 g·L⁻¹ de polpa de banana, podendo concluir que na presença deste suplemento ocorreu maior acúmulo de matéria seca nas raízes e parte aérea das plântulas *in vitro*.

Dentre os componentes principais da polpa de banana es tão 18 a 25% de carboidratos totais, variando de acordo com a variedade analisada, conforme concluíram Jesus *et al.* (2004). Conforme salientado por Bassinello *et al.* (1999) os frutos da bananeira tornam-se doces com o amadurecimento, como resultado da degradação do amido acumulado durante a sua formação,

com conseqüente conversão em açúcares solúveis, especialmente a sacarose. Este carboidrato é um componente indispensável na formulação dos meios de cultura *in vitro*, servindo como fonte de esqueleto carbônico e energia ao explantes.

Nas culturas *in vitro* a proporção de sacarose nas formulações nutritivas permanece entre $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, como no meio C de Knudson; e $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, como no meio MS. Entretanto, o aumento nesta concentração de carboidrato solúvel pode trazer alterações no padrão de desenvolvimento dos explantes. Assim, Chu e Ribeiro (2002) observaram que o aumento na concentração de 6-benzylaminopurine (0 para $22 \mu\text{M}$) e sacarose ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) influenciou o acúmulo de carboidratos solúveis e amido, ao mesmo tempo que retardou o desenvolvimento das folhas em relação às plantas que foram cultivadas em ambiente natural e estimularam a formação de bulbilhos nos explantes de *Dioscorea* cultivadas *in vitro*.

Quanto aos resultados obtidos com a suplementação de sacarose às formulações nutritivas para orquídea *in vitro*, Oliveira (2003) concluiu que $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sacarose foi a melhor concentração de açúcar para o desenvolvimento de plântulas de *Oncidium varicosum*, enquanto que Faria *et al.* (2004) cultivando *Dendrobium nobile* em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura MS, observaram que houve crescimento da parte aérea das plântulas mesmo na ausência de reguladores de crescimento, porém a maior concentração do carboidrato não estimulou o desenvolvimento de novas raízes adventícias.

Buyun *et al.* (2004) obtiveram 100% de germinação de sementes de orquídeas tropicais quando cultivadas em meio Knudson C acrescido de carvão ativado, peptona e $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de íons potássio.

Outro fator diretamente relacionado com o desenvolvimento dos vegetais *in vitro* é o potencial hidrogeniônico do meio de cultura. Os efeitos do pH dependem das substâncias presentes no meio de cultura e em muitos estudos a verdadeira composição do meio de cultura usado não é totalmente conhecida. Sendo difícil determinar se o efeito do pH nos embriões e plântulas é direto ou indireto e devido à disponibilidade dos componentes do meio de cultura (ARDITTI, 1967). Mesmo ajustado, o pH após a autoclavagem pode

influenciar diretamente no desenvolvimento dos tecidos vegetais *in vitro* (ARDITTI e ERNST, 1993).

Arditti *et al.* (1982) afirmam que a faixa ótima de pH do meio nutritivo para a germinação de sementes de orquídeas é de 4,8 a 5,2, entretanto podendo ocorrer germinação na faixa de pH de 3,3 a 3,7. Pierik *et al.* (1988), ao analisarem diferentes pH (5,5; 6,0; 6,5; e 7,0), verificaram bom desenvolvimento de *Paphiopedilum ciliolare* em pH menor que 7,0, com a inibição do crescimento das plântulas sob pH 7,0.

Morales (2004) recomenda que a substituição do meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro* de orquídeas seja realizado de 4 a 5 meses, quando levado em consideração os valores de pH do meio em questão. Skirvin *et al.* (1986), sugerem que embora alguns pesquisadores façam as medições do pH após a autoclavagem, esta prática não é rotineira, não ficando explícito qual valor de pH a cultura foi iniciada.

Além disso, trabalhando com citros Ribeiro *et al.* (1997) relataram que o maior percentual de hidratação de tecidos destas plântulas foi maximizado em pH 6,7 com a concentração de 10,5 g·L⁻¹ de ágar e a menor hidratação ocorreu nos tecidos dos embriões quando cultivados em meio nutritivo com valores de pH mais elevados.

Dos variados meios de cultura utilizados para orquídeas, pode-se verificar uma variação dos valores de pH ajustados antes da autoclavagem ou esterilização por filtração. O meio de cultura KC foi ajustado entre 5,2 a 5,5 por Kerbauy (1984), Lakshmanan *et al.* (1995) e Martini *et al.* (2001). Ao contrário, o meio nutritivo MS (completo ou com metade dos sais), bem como o meio de cultura VW (VACIN E WENT, 1949), modificados ou não, foram ajustados em torno de 5,2 a 5,8 por Chen e Chang (2000) e Chen *et al.* (2002), Huan *et al.* (2004), Lakshmanan *et al.* (1995), e Park *et al.* (2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos relativos ao cultivo assimbiótico de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae) (Figura 1) em meio de cultura, com diferentes variedades comerciais e concentrações de polpa de banana, foram realizados no Laboratório de cultivo de Orquídeas localizado no museu dinâmico interdisciplinar (bloco 33) da Universidade Estadual de Maringá – Paraná.



Figura 1: Flor de *Cattleya walkeriana*.

As plântulas utilizadas foram obtidas de sementes germinadas assimbioticamente sobre meio de cultura C de Knudson (1946), modificado pela substituição de 100 mL/L da água destilada da formulação original, por água de coco (endosperma de frutos imaturos) com seis meses de cultivo (figura 2).



Figura 2: Plântulas de *C. walkeriana*, obtidas da Universidade Estadual de Maringá após 6 meses de cultivo *in vitro*.

O meio de cultura empregado para o crescimento das plântulas de *C. walkeriana* foi o meio KC (KNUDSON, 1946), suplementado com polpa de banana das variedades comerciais “maçã”, “nanica” e “prata”, nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, e 160 g·L⁻¹, sendo o pH ajustado para 5,3 ± 0,1 antes da autoclavagem por 20 minutos a 1 atm.

Também foram realizadas análises das polpas de banana no laboratório de águas e alimentos da Universidade Estadual de Maringá, sendo assim acrescentados no meio; açúcares totais, fósforo, sódio, cálcio e potássio como descrito na (tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de açúcares totais, fósforo, sódio, cálcio, e potássio, acrescidos ao meio nutritivo pela a adição das diferentes concentrações (20 – 160 g· L⁻¹) da polpa de banana maçã (BM), banana nanica (BN), e banana prata (BP).

Concentrações (g· L ⁻¹)	Açúcares totais			fósforo			Sódio			cálcio			Potássio		
	BM	BN	BP	BM	BN	BP	BM	BN	BP	BM	BN	BP	BM	BN	BP
20	4,11	3,36	4,86	4,16	3,08	3,22	1,27	2,79	4,84	0,73	1,03	1,31	58,00	63,83	61,83
40	8,23	6,72	9,73	8,33	6,16	6,45	2,55	5,58	9,68	1,46	2,07	2,63	116,00	127,60	123,67
60	12,34	10,08	14,60	12,49	9,24	9,68	3,83	8,38	14,52	2,20	3,10	3,94	174,00	191,50	185,50
80	16,46	13,44	19,47	16,66	12,32	12,91	5,11	11,17	19,36	2,93	4,14	5,26	232,00	255,33	247,34
100	20,58	16,81	24,34	20,83	15,40	16,14	6,39	13,97	24,20	3,67	5,18	6,58	290,01	319,17	309,18
120	24,69	20,17	29,20	24,99	18,48	19,36	7,66	16,76	29,04	4,40	6,21	7,89	348,01	383,00	371,01
140	28,81	23,53	34,07	29,16	21,56	22,59	8,94	19,55	33,88	5,13	7,25	9,21	406,01	446,83	432,85
160	32,92	26,89	38,94	33,32	24,64	25,82	10,22	22,35	38,72	5,87	8,28	10,52	464,01	510,67	494,68

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação das plântulas, os frascos de cultura foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, e com iluminação contínua obtidas de lâmpadas fluorescentes de 40W.

Após 6 meses *in vitro* as plântulas foram analisadas quanto ao desenvolvimento da parte aérea e raízes (número de folhas, número de raízes, comprimento da parte aérea e comprimento das raízes).

O delineamento experimental foi inteiramente casual, com seis repetições, sendo os dados analisados estatisticamente, utilizando -se o programa SAS (System for Windows V8), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade de erro para a comparação das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da adição de concentrações de polpa de banana para o desenvolvimento de raízes e de folhas em plântulas de *Cattleya walkeriana*

A adição de diferentes concentrações de polpa de banana ao meio de cultura KC estimulou a produção de raízes nas plântulas de *Cattleya walkeriana* (Tabela 2). O efeito da adição de polpa de banana foi mais pronunciado para estimular a indução de raízes nas concentrações de 80 e 100 g·L⁻¹ (Figura 3B), mas foi possível evidenciar que qualquer uma das diferentes concentrações de polpa de banana estimulou a indução de raízes quando comparada com a ausência de polpa de bananas (Tabela 3). O menor número de raízes em plantas de *C. walkeriana* foi verificado na ausência de qualquer uma das oito concentrações de polpa de bananas testadas no presente estudo (Figura 3A). Por outro lado, também foi evidente que concentrações de polpa de banana igual ou maior que 120 g·L⁻¹ determinaram um número de raízes menor que o número verificado com a adição de 80 ou 100 g·L⁻¹. Isso é uma evidência de que o efeito positivo da adição de polpa de bananas ao meio de cultura é dependente da concentração usada.

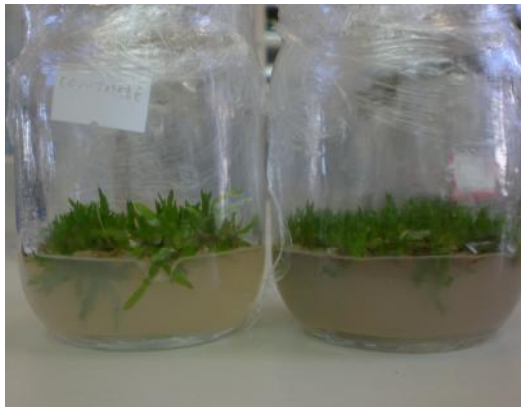


Figura 3A: Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC.



Figura 3B: Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 80 g·L⁻¹.

O tipo de banana também estimulou de forma diferencial a indução de raízes nas plântulas de *C. walkeriana* (Tabela 2). A Tabela 2 mostra os efeitos diferenciais significativos das diferentes concentrações de polpa das 3 variedades de bananas e a interação significativa entre as diferentes concentrações e o tipo de banana usado para a produção de raízes nas plântulas de *C. walkeriana*. As adições de polpa de bananas nanicas e bananas prata induziram a formação de um número maior de raízes nas plântulas de *C. walkeriana* (Tabela 3). As diferentes concentrações de polpa de banana maçã foram menos eficientes do que a polpa de banana nanica ou de banana prata, para estimular a formação de raízes nas plântulas de *C. walkeriana*.

A comparação do número de folhas formadas nas plântulas de *C. walkeriana* mostrada nas Tabelas 2 e 3 também evidenciam que a suplementação do meio KC com diferentes concentrações de polpa de banana é uma estratégia interessante para estimular a produção de partes aéreas nestas plântulas. Nas plântulas de *C. walkeriana* o maior número de folhas foi observado naquelas cultivadas com concentrações de 120 e 140 g·L⁻¹, superiores a 100 g·L⁻¹ considerada como adequada para estimular a produção de raízes. A concentração de 120 g·L⁻¹ de polpa de banana (Figura 4) também foi efetiva para estimular o alongamento das raízes e das folhas (Tabela 3).

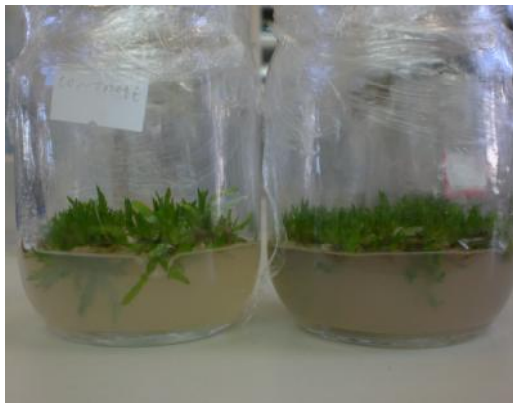


Figura 3A: Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC.



Figura 4 Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 120 g·L⁻¹.

TABELA 2. Análise de variância para as características NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas) de plântulas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC suplementados com 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 g·L⁻¹ de polpa de 3 tipos de bananas (maça, nanica, e prata) e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

Fontes de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		NR	NF	CR	CF	pH
Concentração	8	45,7281**	48,9765**	130,0365**	22,9742**	8,7530**
Tipo de banana	2	16,5125*	70,5468**	30,4001**	0,8256 ^{ns}	17,2778**
Concentração x Tipo de Banana	14	12,3375**	17,4968**	15,4765**	3,3400**	2,6592**
Resíduo	975	1,8650	1,6527	2,0472	0,2242	0,0340
CV (%)		42,03	24,15	46,67	28,32	5,37

** Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F

NS Não significativo.

O efeito diferencial dos tipos de bananas usados também foi evidente na indução de partes aéreas das plântulas e também para estimular o crescimento das folhas e raízes (Tabela 3). As Tabelas 2 e 3 mostram os efeitos significativos e contrastantes da adição de polpa de banana maçã para a indução de folhas e para o crescimento destas. O número de folhas nas plântulas de *C. walkeriana* foi maior no meio KC suplementado com polpa de banana maçã, mas para o crescimento destas é possível recomendar a adição de polpa de banana prata ou nanica, porque o crescimento das folhas foi igualmente maior nos meios suplementados com polpa de banana prata ou com polpa de banana nanica. A Tabela 3 mostra ainda que a polpa de banana prata e de banana nanica, em qualquer das concentrações foram igualmente eficientes para induzir a formação e o crescimento das raízes em plântulas de *C. walkeriana*.

Tabela 3. Teste de média para as variáveis NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento das folhas), das plântulas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC contendo diversas concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, e 160 g·L⁻¹) de polpa de banana (maçã, nanica, prata), e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

Concentrações (g·L ⁻¹)	NR	NF	CR	CF	pH
Zero	1,88 ^d	5,40 ^{bc}	0,97 ^e	1,03 ^d	3,07 ^f
20	2,98 ^c	4,89 ^{cd}	1,45 ^{de}	1,08 ^d	3,03 ^f
40	3,33 ^{bc}	5,05 ^{bcd}	1,86 ^d	1,18 ^d	3,16 ^e
60	3,63 ^b	5,48 ^b	3,35 ^{bc}	1,56 ^c	3,34 ^d
80	3,78 ^{ab}	4,61 ^d	3,44 ^{bc}	1,71 ^c	3,44 ^c
100	4,25^a	4,64 ^d	3,91 ^{ab}	1,98 ^b	3,51 ^b
120	3,28 ^{bc}	6,46^a	4,42^a	2,38^a	3,53 ^b
140	3,0 ^c	6,13^a	3,89 ^{ab}	2,13 ^b	3,57 ^b
160	2,20 ^d	5,29 ^{bc}	2,91 ^c	1,57 ^c	3,98^a
Tipo de banana					
maçã	2,92 ^b	5,80^a	2,76 ^b	1,58 ^b	3,21 ^c
nanica	3,36^a	5,14 ^b	2,97 ^b	1,68^a	3,42 ^b
prata	3,50^a	4,96 ^b	3,50^a	1,75^a	3,69^a

Médias seguidas pelas letras não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Deste modo, para promover o desenvolvimento de plântulas de *C. walkeriana* em meio KC suplementado com polpa de banana, uma estratégia que pode ser recomendada é que as plântulas sejam inoculadas inicialmente no meio suplementado com 80 – 100 g·L⁻¹ de banana prata, e após a formação de novas raízes estas plântulas sejam transferidas para meio KC contendo 120 g·L⁻¹ para estimular o crescimento das raízes e crescimento das folhas. Embora o número de folhas formadas tenha sido maior em meio suplementado com banana maçã, a transferência para o meio contendo 120 g·L⁻¹ de banana prata parece ser uma forma de economizar tempo e capital.

O efeito positivo da polpa de banana maçã para induzir a formação de partes aéreas foi também evidente na análise da formação de brotos (gemas) nas plântulas de *C. walkeriana* (Tabelas 4 e 5). O número maior de brotos foi verificado nas concentrações maiores de polpa de banana (140 e 160 g·L⁻¹) e no meio suplementado com polpa de banana nanica ou de banana maçã. A comparação do número médio de brotos formados nas plântulas mantidas no meio suplementado com polpa de banana nanica e de banana maçã foram igualmente eficientes pelo teste de Tukey (Tabela 5).

TABELA 4. Análise de variância para as características NB (número de brotos) formados em plântulas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC suplementados com 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 g·L⁻¹ de polpa de 3 tipos de bananas (maça, nanica, e prata) e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

Fonte de Variação	Quadrados Médios		
	GL	NB	pH
Concentração	8	61,7100**	0,8816**
Tipo de Banana	2	91,0104*	1,6796**
Concentração x Tipo de Banana	14	36,1056**	0,2658**
Resíduo		9,59	0,0445
CV (%)		57,24	6,13

** Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F
 NS Não significativo.

Em outras espécies do gênero *Cattleya*, o procedimento recomendado para induzir a formação de brotos para a micropropagação *in vitro* destas espécies e

também de híbridos de *Cattleya*, tem sido a adição de IBA (ácido indolbutírico) ao meio de cultura (KERBAUY, 1991). Para a espécie *C. walkeriana*, a adição de 1,0 ou 1,5 mg·L⁻¹ de IBA sozinho ou combinado com 6-BA foi considerado como a forma mais efetiva para induzir o brotamento e o desenvolvimento de plantas (partes aéreas e raiz) (KRAPIEC ET AL., 2003). Ainda estes mesmos autores, relataram que o número médio de brotos formados em meio de cultura suplementado com 1,5 mg·L⁻¹ de IBA foi cerca de 2,78 brotos por plântulas. Apesar do número de brotos registrados pelos referidos autores ter sido considerado como eficiente para realizar a micropropagação da espécie *C. walkeriana*, a suplementação do meio KC com as diferentes concentrações de polpa de banana testadas no presente estudo (20 – 160 g·L⁻¹) foram mais eficientes porque induziram valores maiores do que 2,79 brotos por plântula (Tabela 5) para o número médio de brotos induzidos nas plântula de *C. walkeriana*. No meio suplementado com 160 g·L⁻¹ de polpa de banana, o número médio de brotos formados foi igual a 10,25 brotos por plântula (Figura 5), atestando desta forma, a eficácia da suplementação do meio de cultura com polpa de banana, e sugerindo um efeito para a polpa de banana que simula o efeito da auxina IBA ao meio de cultura.

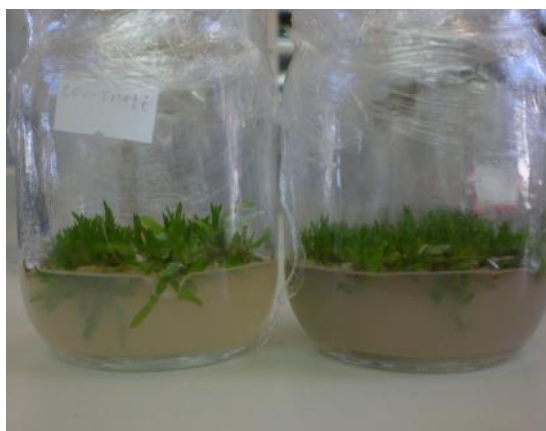


Figura 3A: Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC.



Figura 5: Culturas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC suplementado com polpa de banana 160 g·L⁻¹.

Tabela 5. Teste de média para as variáveis NB (número de brotos) formados em plântulas de *Cattleya walkeriana*, cultivadas em meio KC contendo diversas concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, e 160 g·L⁻¹) de polpa de banana (maçã, nanica, prata), e variação do pH do meio após 6 meses da inoculação.

Concentrações (g·L⁻¹)	NB	pH
Zero	5,750 ^b	3,07 ^{de}
20	3,917 ^b	3,03 ^e
40	2,790 ^b	3,17 ^{cde}
60	4,167 ^b	3,37 ^{bcd}
80	5,667 ^b	3,44 ^{bc}
100	3,417 ^b	3,51 ^b
120	6,167 ^b	3,53 ^b
140	6,833 ^{ab}	3,57 ^b
160	10,250^a	3,98^a
Tipo de banana		
maçã	4,9722^a	3,21 ^c
nanica	7,2813^a	3,42 ^b
prata	4,0313 ^b	3,69^a

Médias seguidas pelas letras não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

A polpa de bananas tem sido usada como suplemento de diferentes meios de cultura de orquídeas desde 1950, conforme registrado no trabalho de revisão de Yam e Arditti (2009). O efeito positivo da primeira adição de polpa de banana, feita no Brasil pelo pesquisador Graefling er, estimulou diversos pesquisadores da área a adotar esta prática, independentemente de conhecer os efeitos específicos

da polpa de banana (ARDITTI E ERNST, 1984). Seis décadas após a adoção desta prática, a polpa de banana continua sendo usada empiricamente como suplemento de diferentes tipos de meios de cultura, em diferentes concentrações, para diferentes espécies de orquídeas, porém sem subsídios concretos para definir seus efeitos. A polpa de banana que foi usada em princípio para estimular a germinação assimbiótica das sementes e para promover o desenvolvimento de PLBs (ARDITTI E ERNST, 1984), mais recentemente tem sido adicionada em diferentes meios de cultura, também suplementados com combinações de auxinas e citocininas, para estimular a formação e o crescimento de raízes (ALAM *ET AL.*, 2006; DECRUSE *ET AL.*, 2008) ou de partes aéreas (MILLNER *ET AL.*, 2008).

De fato, as evidências obtidas no presente estudo com o desenvolvimento das plântulas de *C. walkeriana* em meio KC contendo diferentes concentrações de 3 variedades de bananas está indicando um efeito positivo da polpa de banana para o desenvolvimento de raízes e também de folhas, dependendo da concentração e da variedade de banana utilizada. A concentração de 100 g·L⁻¹ de banana prata ou nanica induziu o aumento no número de raízes, a concentração de 120 g·L⁻¹ de banana maçã induziu o aumento no número de folhas, e 120 g·L⁻¹ de banana prata foi eficiente para o crescimento das raízes e das folhas nas plântulas de *C. walkeriana*.

Desta forma, os efeitos das diferentes concentrações de polpa de banana parecem simular os efeitos de diferentes proporções de auxinas e citocininas quando adicionados em meio de cultura. Para diversas espécies de plantas, a maior proporção de auxina em relação a citocinina e estimula a formação de raízes, enquanto que maiores proporções de citocinina em relação a auxinas estimulam o desenvolvimento de partes aéreas Rodrigues (2009). Nas plântulas de *C. walkeriana*, o aumento na concentração de polpa de banana de 100 para 120 g·L⁻¹ foi mais adequado para o a indução e crescimento de folhas, sugerindo que a adição de 120 g·L⁻¹ de polpa de banana possa estar determinando um predomínio de citocininas no meio de cultura. Recentemente a análise de polpa de bananas (*Musa spp.*) mostrou a presença de citocininas (GE *ET AL.*, 2008). Embora esta investigação não tenha especificado se uma ou mais variedades de bananas

foram analisadas, foram identificados dois tipos de zeatina presentes na polpa de banana pelo método de análise descrito por Ge *et al.* (2008).

Assim, as evidências de Ge *et al.*, (2008) e os resultados do presente estudo com o cultivo *in vitro* das plântulas de *C. walkeriana* confirmam a nossa hipótese de que as adições de diferentes concentrações de polpa de banana podem determinar respostas diferentes das plântulas cultivadas *in vitro*, e alertam para a necessidade de se testar diferentes concentrações de polpa de banana, dependendo do objetivo específico da cultura (indução de raízes ou crescimento destas e de partes aéreas). Para o cultivo *in vitro* das plântulas de *C. walkeriana*, a adição de diferentes concentrações de polpa de banana induziu respostas no mesmo sentido das respostas determinadas pela adição de diferentes proporções da auxina IBA e das citocininas KIN e 6-BA descritas por Krapiec *et al.* (2003), de modo que uma determinada concentração de polpa de banana foi adequada enquanto que outras concentrações mais baixas ou mais altas não induziram respostas significativamente diferentes das plântulas cultivadas na ausência de polpa de banana.

Apesar das concentrações diferentes de IBA ou de KIN, e dos diversos tipos de explantes utilizados nos experimentos registrados na literatura especializada, é possível verificar que a adição de IBA em meio de cultura KC estimula a formação de raízes, mas é dispensável para crescimento destas, e para o desenvolvimento (indução e crescimento) de folhas em plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia alba*, conforme foi verificado para a espécie *C. fimbriatum* (PERES ET AL., 1999). O efeito positivo da adição de KIN ao meio de cultivo para a regeneração de plantas de uma espécie de *Dendrobium*, registrado por Khosravi *et al.* (2008), também pode ser estendido para o crescimento das raízes e desenvolvimento (indução e crescimento) das partes aéreas nas plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia alba*.

Por outro lado, a adição de polpa de bananas, de um ou outro tipo, também pode determinar uma modificação na concentração de sais no meio de cultura, e/ou de açúcares e proteínas, por exemplo. Embora a análise preliminar de concentrações de proteína bruta, de açúcar total, de fosfato, de sódio, de cálcio, e

de potássio, da polpa das três variedades de banana, não tenham mostrado diferenças significativas (Tabela 6), que pudessem ser correlacionadas com os diferentes efeitos de cada variedade de banana para promover o desenvolvimento de raízes e de partes aéreas das plântulas de *C. walkeriana*, vários estudos têm indicado que a concentração de açúcar no meio de cultura é um fator preponderante para o desenvolvimento de plântulas de orquídeas. A sacarose, por exemplo, tem sido considerada como um componente indispensável na formulação dos meios de cultura *in vitro*, servindo como fonte de esqueleto carbônico e energia aos explantes. Oliveira (2003) concluiu que 60 g·L⁻¹ sacarose foi a melhor fonte e concentração de açúcar para todos os parâmetros avaliados na espécie *Oncidium varicosum*. Faria *et al.* (2004) cultivando *Dendrobium nobile*. (orquídea epífita) em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) observaram que houve crescimento da parte aérea das plântulas sem a adição de reguladores de crescimento.

TABELA 6. Análise de variância e teste de médias para as características concentrações de PB (proteína bruta), AT (açúcar total), P (fosfato), Na (sódio), Ca (cálcio), e K (potássio) de polpa de banana maçã, nanica, e prata, usadas para suplementar o meio de KC para o cultivo de plântulas de *Cattleya walkeriana*.

Quadrados Médios								
Fonte	de	GL	PB	AT	P	Na	Ca	K
Varição								
Tipo	de	2	0,079ns	42,53	25,95	237,83	6,34	658,95
Banana								
Resíduo			0,017	5,14	19,51	96,82	1,49	1667,54
CV (%)			14,42	11,02	25,29	66,23	23,78	13,33
Maçã			1,11 ^a	20,58 ^{ab}	20,89 ^a	6,39 ^a	3,67 ^a	290,01 ^a
Nanica			0,84 ^a	16,81 ^b	15,40 ^a	13,97 ^a	5,18 ^a	319,17 ^a
Prata			0,82 ^a	24,34 ^a	16,15 ^a	24,21 ^a	6,58 ^a	309,18 ^a

** Significativo em nível de 1 % de probabilidade, teste F

NS Não significativo.

Trabalhando com orquídeas em várias concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, Sorace (2008) constatou que o meio contendo 40 g·L⁻¹ de sacarose e a metade da concentração dos macronutrientes do meio MS, foi o mais eficiente para o desenvolvimento vegetativo e para o enraizamento da orquídea *Oncidium baueri*. Stefanelo *et al* (2009) trabalhando com *Miltonia flavescens* Lindl concluíram que as concentrações de 15 e 30 g·L⁻¹ de sacarose, independentes do pH, mostraram-se mais eficientes para o cultivo *in vitro* da espécie proporcionando a formação de um maior número e comprimento de raízes, altura de parte aérea e peso da matéria fresca. O pH só apresentou um efeito significativo quando em combinação com 15 g·L⁻¹ de sacarose para o variável comprimento da maior raiz e peso da matéria fresca.

Em várias outras culturas de diferentes espécies de plantas, também foi possível observar que a concentração de sacarose no meio de cultura tem efeitos positivos. Nagao *et al* (1994) estudando os efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico, *in vitro*, na cultura de citros observaram que as doses da sacarose e do nitrogênio inorgânico afetaram as características avaliadas, sendo as melhores respostas obtidas quando utilizaram concentrações entre 30 e 45 g·L⁻¹ da sacarose. Calvete *et al.* (2002) observaram que em plantas de morangueiro cultivadas na ausência de sacarose não houve desenvolvimento da raiz *in vitro*, enquanto em plantas produzidas na concentração de 45 g·L⁻¹ de sacarose, apresentaram maior enraizamento. Em plantas de manjerição, por exemplo, Ribeiro (2007) relatou que a adição de 3 fontes de carbono (sacarose, glicose e maltose) nas concentrações de 2% ou 3% no meio MS com concentração total dos sais, proporcionou maior número de folhas.

As medidas das quantidades de açúcares totais na polpa dos 3 tipos de bananas (maçã, nanica, e prata) adicionados nas culturas de *C. walkeriana* no presente estudo (tabela 6), não mostraram diferenças significativas, mas é possível que os tipos de fontes de carbono, sacarose, glicose, frutose, ou maltose, em cada uma das variedades de bananas, sejam diferentes, e possam estar determinando respostas diferenciais no que se refere a indução de maior número de raízes com a adição de polpa de banana nanica e prata, e maior indução de número de folhas com a adição de banana maçã. Na literatura especializada, há indicativos com outras espécies de plantas, de que diferentes concentrações e de tipos de fontes de carbono podem determinar um maior ou menor desenvolvimento de tecidos vegetais cultivados *in vitro*. A adição de 3% de glicose na cultura de tecidos de uma espécie de cactos, por exemplo, induziu um maior crescimento dos tecidos, do que a adição de sacarose e de frutose, na mesma concentração (OLIVEIRA *ET AL.*, 1996). Deste modo, parece que é importante caracterizar os tipos e concentrações de açúcares (sacarose, glicose, frutose, etc.) nas variedades diferentes de bananas, para investigar se o efeito diferencial das variedades de bananas no desenvolvimento das plântulas de *C. walkeriana*, está relacionado com um aumento na concentração de determinado tipo de açúcar.

As medidas das quantidades de potássio na polpa dos 3 tipos de bananas (maçã, nanica, e prata) adicionados nas culturas de *C. walkeriana* no presente estudo, também não mostraram diferenças significativas, embora alguns autores (HIROCE *ET AL.*, 1977) considerem que dentre os sais minerais presentes nos frutos de banana os teores de potássio podem ser considerados expressivos e importante para a suplementação de meios de cultura. Para verificar a importância da suplementação do meio de cultura com íons potássio, Figueiredo *et al.* (2008) verificaram que a combinação de 500 mg·L⁻¹ de KCl com 500 mg·L⁻¹ de K₂SO₄ promoveu maior crescimento *in vitro* em plântulas de *C. loddigesii*, exceto em relação ao comprimento das raízes, que se apresentou melhor com 500 mg·L⁻¹ de KCl na ausência de K₂SO₄.

4.2 Alterações de pH do meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de polpa de banana, após 6 meses de cultivo das plântulas de *Cattleya walkeriana*

As variações de pH no meio suplementado com as diferentes concentrações de polpa de bananas foram menores do que as variações registradas no meio de cultura das plântulas de *C. walkeriana* cultivadas na ausência de polpa de bananas (Tabelas 1, 2, 3, e 4). A Tabela 2 registra que a diminuição de pH após 6 meses de cultivo foi menor no meio KC contendo a maior concentração de polpa de banana (160 g·L⁻¹) testada no presente estudo, conduzindo a uma hipótese de que concentrações maiores de polpa de banana poderiam ser adequadas para prevenir variações do pH do meio cultivo. Mas, embora exista esta suspeita, concentrações superiores a 120 g·L⁻¹ não devem ser recomendadas para o cultivo *in vitro* das plântulas de *C. walkeriana*, porque em meios contendo concentrações superiores a 120 g·L⁻¹ de polpa de banana, o crescimento das raízes e das folhas foi menor do que na referida concentração.

Variações no pH do meio de cultivo *in vitro* de tecidos de orquídeas tem sido registradas em vários estudos com diferentes espécies, mas tem sido um tema pouco explorado. Embora se trate de um tema pouco explorado, as observações de alterações de pH no meio de cultura foram registradas desde a década de 80 (SKIRVIN *ET AL.*, 1986), e posteriormente foram consideradas como dependentes da espécie (MORALES *ET AL.*, 2006; PRIZAO, 2006). Foi apenas postulado que a interação de explantes diferentes (de diferentes espécies) com o meio de cultivo pode determinar a liberação de substâncias diversas, que em contato com o meio determinam alterações na composição e disponibilidade dos sais minerais, e conseqüentemente, determinam alterações de pH do meio de cultura.

Mais recentemente, Rodrigues (2009) verificou que a adição de auxina (IBA) ou de citocinina (KIN) no meio de cultura foi significativamente marcante para promover variações maiores do pH na cultura das espécies *Cattleya intermedia alba* e *C. bicolor*, e que a variação de pH no meio sem os reguladores de crescimento foi maior no meio contendo as plântulas de *C. bicolor*, do que no meio KC contendo as plântulas de *C. intermedia alba*, indicando que a variação de pH no meio KC são dependentes do genótipo dos explantes inoculados. As plântulas de *C. intermedia alba* induziram uma variação menor no pH do meio KC do que as plântulas de *C. bicolor*. Além disso, este mesmo autor (RODRIGUES, 2009) registrou que as variações de pH no meio de cultivo de plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia alba* suplementado com combinações de IBA e 6-BA foram importantes para determinar uma menor variação no pH do meio de cultura após os 6 meses de cultivo *in vitro*, e sugeriu a existência de uma interação significativa para o efeito das combinações de IBA e 6-BA com os dois genótipos de *Cattleya*. Desta forma, as variações de pH do meio KC foram dependentes das concentrações de IBA e de 6-BA, e foram diferentes dependendo da espécie de *Cattleya*.

As evidências da investigação acima referida indicam uma certa complexidade para uso de reguladores de crescimento no que se refere a manter a estabilidade de pH no meio de cultivo, e apontam para uma perspectiva positiva

quanto a utilização de polpa de banana em substituição aos reguladores de crescimento para promover o desenvolvimento de plântulas de *C. walkeriana* *in vitro* e provocar menores variações de pH do meio de cultivo.

5. CONCLUSÕES

5.1 A adição de diferentes concentrações de polpa de banana (20 – 160 g·L⁻¹) ao meio de cultura KC para o cultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* simulam os efeitos da adição de diferentes proporções de auxinas e citocininas quando adicionados em meio de cultura: a concentração de 100 g·L⁻¹ de banana prata ou nanica induziu o aumento no número de raízes, a concentração de 120 g·L⁻¹ de banana maçã induziu o aumento no número de folhas, e 120 g·L⁻¹ de banana prata foi eficiente para o crescimento das raízes e das folhas nas plântulas de *C. walkeriana*;

5.2 A adição de diferentes concentrações de polpa de banana (20 – 160 g·L⁻¹) ao meio de cultura KC para o cultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya walkeriana* simulam os efeitos da adição de diferentes proporções de açúcares adicionados em meio de cultura: a concentração de 100 g·L⁻¹ de banana prata ou nanica induziu o aumento no número de raízes, a concentração de 120 g·L⁻¹ de banana maçã induziu o aumento no número de folhas, e 120 g·L⁻¹ de banana prata foi eficiente para o crescimento das raízes e das folhas nas plântulas de *C. walkeriana*;

5.3 Embora não possam ser consideradas como mais efetivas para o desenvolvimento de plântulas de *C. walkeriana*, as concentrações maiores de polpa de banana usadas (140 e 160 g·L⁻¹) asseguram uma menor variação de pH do meio KC do que as concentrações que foram considerada eficientes para induzir raízes (100 g·L⁻¹) e para induzir folhas e promover o crescimento de raízes e folhas (120 g·L⁻¹); a adição de 160 g·L⁻¹ de polpa de banana determinou uma maior estabilidade do pH do meio de cultura;

5.4 Para promover o desenvolvimento de plântulas de *C. walkeriana* em meio KC usando polpa de banana, a estratégia recomendada é que as plântulas sejam inoculadas inicialmente no meio suplementado com 100 g·L⁻¹ de polpa de

banana prata ou nanica, e após a formação de novas raízes estas plântulas sejam transferidas para meio KC contendo concentrações igual a $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de polpa de banana prata.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. K.; RASHID, M. H.; HOSSAIN, M. S.; SALAM, M. A.; ROUF, M. A. *In vitro* seed propagation of *Dendrobium (Dendrobium transparens)* orchid as influenced by different media. **Biotechnology.**, v.1, p. 111-115, 2002.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: Wiley Interscience, 1993.

ARDITTI, J. et al. Orchid seed germination and seedling culture – manual. In: ARDITTI, J. (Ed.) **Orchid biology: reviews and perspective II**. New York: Cornell University Press. 1982, 390 p.

ARDITTI, J. ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives III** - New York: Cornell University Press, p.178-222, 1984.

ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **Botanical Review.**, v. 33, p. 1-97, 1967.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1992. 691p.

ARAUJO, A. G. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas. 2004. n. 73 f. **Dissertação** (mestrado) – UFLA. Lavras, 2006.

BASSINELLO, P. Z.; NASCIMENTO, F. J. R. O.; CORDENUNS, B. R.; LAJOLO, F. M. Distribuição da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase em bananas durante o amadurecimento **Ciência Tecnologia Alimentos**. vol. 19, Campinas Jan./Apr.,1999.

BUYUN, L.; LAVRENTYEVA, A.; KOVALSKA, L.; IVANNIKOV, R. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, v. 676, p. 159-162. 2004.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA/CNPH**, 1998. v.1, p.87-132.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro **Horticultura brasileira.**, v. 20, n. 2, jun. 2002.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Sciences.** v. 160, p. 87-93, 2000.

CHEN, L. R.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient production of protocorm -like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.** v. 38, p. 441-445, 2002.

CONVENCIÓN sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. 2002. Disponível em: <<http://cites.org/esp/cttre/plants/12/s-PC/12-10-01annex.pdf>>. Acesso em: 14 de novembro de 2008.

CHU E.P.; FIGUEIREDO RIBEIRO, R.C.L. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations, **Plant Cellular Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 241-249, 2002.

DECRUSE, S.W.; GANGAPRASAD, A.; SEENI, S.; MENON, V.S. Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, na exquisite orchid. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 199-202, 2003.

DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. **Portland: Dioscorides Press**, 1993.

FIGUEIREDO, M. A. de.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. Fontes de potássio no crescimento in vitro de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii* **Ciência Rural** vol.38, Jan. /Feb., 2008.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations., **Horticultura Brasileira.** Brasília, v. 22, p. 780-783, 2004.

FLACHSLAND, E. A.; TERADA, G. Medios de cultivo para la germinacion *In vitro* de 41 espécies de orquídeas. **Pacena.** v. 12, 1996.

FREITAS, A. GONÇALVES, L. M. MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Efeito do meio de cultura no desenvolvimento das plântulas de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae) provenientes de sementes estocadas. In: XXI Semana da Biologia , VIII Encontro Maringense de Biologia., 2006, Maringá – PR. **Arquivos do Mudi**. Resumos de trabalhos apresentados, 2006. v. 10, p. 59.

GE, L.Y.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; HUA, L.; ONG, E.S. Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. **Electrophoresis**, v. 32, p. 2024-2032, 2008.

GONÇALVES, L. M. PRIZÃO, E. C. MILANEZE -GUTIERRE, M. A. Influência da composição do meio de cultura sobre a germinação das sementes de duas espécies de orquídeas brasileiras mantidas estocadas por 4 anos. . In: **XXI Semana da Biologia , VIII Encontro Maringense de Biologia** . 2006, Maringá – PR. Arq. Mud. Resumos de trabalhos apresentados, 2006. v. 10, p. 55.

HINNEN, M. G. J.; PIERIK, R. L. M.; BRONSEMA, F. B. F. The influencia of macronutrientes and some other factores on groeth of Phalaenopsis hybrid seedlings in vitro. **Sciences Horticulture**, v. 41, p. 105-116, 1989.

HIROCE, R.; CARVALHO, A. M.; BATAGLIA, O. C.; FURLANI, P. R.; FURLANI, A. M. C.; SANTOS, R. R.; GALLO, J. R. Composição mineral de frutos tropicais na colheita. **Bragantia**, v. 36, p. 14, 1977.

HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Sciences**., v. 166, p. 1443-1449, 2004.

JESUS, S. C. de J.; FOLEGATTI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira **Bragantia**, v.63, p.315-323, 2004.

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

KERBAUY, G. B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 27-39, 1984.

KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warszewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 157-159, 1996.

KHOSRAVI, A.R.; KADIR, M. A.; KAZEMIN, S. B.; ZAMAN F.Q.; DE SILVA, A. E. Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv. Serdang Beauty. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4093–4099, 2008.

KRAPIEC, P.V.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; MACHADO, M.F.P.S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum**, v.25, p. 179-182, 2003.

LAKSHMANAN, P.; LOH, C. S.; GOH, C. J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using thin section cultura. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 510-514, 1995.

LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; KUO, C. L.; CHEN, C. L.; TSAY, H. S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – A medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.

MARTINI, P. C.; WELLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagation of orchid *Gongora quinquenervis* *in vitro* germination. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1319-1324, 2001.

MILLNER, H.J.; OBERG, A.; MCCREA, A.R.; BALDWIN, T.C. Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135, p. 497-505, 2008.

MORALES, S. Efeito de aditivos no cultivo *in vitro* de plântulas de *Catasetum fimbriatum* (E.MORREN) LINDL. e PAXTON, *Encyclia randii* (BARB. RODR.) PORTO e BRADE e de um híbrido de *Laelia* LINDL. x *Cattleya* LINDL.(ORCHIDACEAE). 2004. 38 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MORALES, S.; MILANEZE, M. A. G.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of Activated Charcoal for Seedling Development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences**, v. 1, p. 388-391, 2006.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiology Plant.** v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAO, E. S.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "in vitro" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, v. 53, p. 25-31, 1994.

OLIVEIRA, L. DO. V. R.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. de B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento in vitro de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) **Ciências Agrárias**, v. 24, p. 265-272, 2003.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de Orquídeas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2002. 63 p.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture., **Plant Cell Reports.**, v. 21, p. 46-51, 2002.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports.**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

PIERIK, R.L.M.; SPRENKELS, P.A.; VAN DER HARST. B.; VAN DER MEYS, Q.G. Seed Germination and Further Development of Plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *In Vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.34, p.139-153, 1988.

PRIZÃO, E. C.; GONÇALVES, L. M.; MILANEZE -GUTIERRE, M. A.; MACHADO, M. F. P. S. Influencia de diferentes concentrações de carvão ativado e de grafite sobre o desenvolvimento inicial de *Cattleya bicolor* Lindl. e do híbrido 'BLC Pastoral Inocence' (Orchidaceae). In: **XXI Semana da Biologia , VIII Encontro Maringaense de Biologia**. 2006, Maringá – PR. Arq. Mud. Resumos de trabalhos apresentados, 2006. v. 10, p. 55-56.

RIBEIRO, M. DE. F.; DONINI, L. P.; SOUZA, J. A.; MOURA, A. P. G. I. F.; BOBROWSKI, V. L. E VIÉGAS, J. Influência de Diferentes Concentrações de Sais de MS e Açúcares no Cultivo In Vitro de Manjeriçã Roxo (*Ocimum basilicum* L.) **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 57-59, 2007.

RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; JUNIOR, A. F. de O.; CARVALHO, G. R. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira pêra. **Dissertação**, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 1997.

RODRIGUES, G. Comparação no desenvolvimento dos explantes de *cattleya alba*, e *cattleya intermédia* "híbrido", em diferentes concentrações de hormônios. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, 2009.

SILVA, E.F. Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassicocattleya* 'Pastoral' X *Laeliocattleya* 'Amber Glow'. **Dissertação**. UFLA. Lavras – MG. p. 62, 2003.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. W. Stability of tissue culture medium pH as function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Pant Cell Reports.**, v. 5, n. 4, p. 292-294, 1986.

Soncin, C.A. **Logística de exportação de flores no Brasil**. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/12/01P062.pdf>. Acesso em 10 de maio de 2009.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; JÚNIOR, C. V. D.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 775-782, 2008.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos **Bragantia**, vol. 67, p. 1, 2008.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MÜLLER, T. S.; TOMCZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *miltonia flavescens* lindl. em protocormos e regeneração de plantas **Ciências Agrotécnicas.**, vol.33, p. 19, 2009.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADIONO, L.; GUERRA, M. P.; FERRERIA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Brasília: **EMBRAPA-CNPB**, (EMBRAPA-CNPB. Circular Técnica), 2001.

YAM, T.W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reporter**, v. 3, p. 1-56, 2009.

YAM, T.W.; WEATHERHEAD, M. A. Germination and seedling development of some Hong Kong orchids. **Lindleyana**, v.3, p. 156-160, 1988.