

INFLUÊNCIA DE VITAMINAS NO DESENVOLVIMENTO DE *CATTLEYAS*

LEANDRO HARUO SAWAMURA

INFLUÊNCIA DE VITAMINAS NO DESENVOLVIMENTO DE *CATTLEYAS*

LEANDRO HARUO SAWAMURA

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

635.934 4 Sawamura, Leandro Haruo
S271i Ifluência de vitaminas no desenvolvimento de
Cattleyas / Leandro Haruo Sawamura – Presidente
Prudente, 2016.
41f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

1. Orquídeas. 2. Ácido nicotínico. 3. Piridoxina.
4. Tiamina. I. Título.

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000

Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INFLUÊNCIA DE VITAMINAS NO DESENVOLVIMENTO DE CATTLEIAS"

AUTOR(A): LEANDRO HARUO SAWAMURA

ORIENTADOR(A): NELSON BARBOSA MACHADO NETO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em
AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Lima Abrantes



UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto



UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria



UEL – Universidade Estadual de Londrina (PR)

Data da realização: 19 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista pela excelente estrutura fornecida para a realização do trabalho acadêmico;

Ao meu orientador, professor Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, por seu apoio, conselhos, além da sua dedicação e competência com os alunos e orientados;

À CAPES, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa científica;

Aos colegas de laboratório e colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, bem como os funcionários do Programa e da Universidade, pelo companheirismo diário e laços de amizade que formamos neste período, em especial ao Silvério Hosomi e Joice Minamiguchi;

Aos professores do mestrado que muito contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal;

Aos meus pais, Rosa e Mitsuo, pelo incentivo para seguir em frente;

À minha irmã, Cris, por sempre estar presente comigo nessa jornada da vida;

Aos meus familiares que sempre estiveram torcendo para o meu sucesso e felicidade;

Aos meus amigos, por estarem sempre me apoiando nas minhas decisões e compreenderem a minha ausência devido à pesquisa;

Às professoras Dras. Ceci e Fabiana que destinaram parte de seu precioso tempo para participarem da minha qualificação, e que muito contribuíram com sugestões e correções.

Ao professor Dr. Ricardo de Faria e a professora Dra. Fabiana Abrantes que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa, proporcionando um amplo aprendizado.

RESUMO

Influências de vitaminas no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de *Cattleyas* brasileiras

As vitaminas pertencem a um grupo de nutrientes orgânicos, sendo essenciais em pequenas quantidades a qualquer ser vivo, desempenhando funções diversas no metabolismo e atuando como antioxidantes e indutores de resistência. A carência das vitaminas pode acarretar diversos problemas de desenvolvimento e metabolismo, assim como o excesso também pode ser tóxico. A limitada quantidade de estudos referentes ao assunto em relação a orquídeas justificou a necessidade deste trabalho, que teve como objetivo avaliar a influência das vitaminas do complexo B, tiamina (B₁), nicotinamida (B₃) e piridoxina (B₆) no desenvolvimento e crescimento de plântulas de *Cattleya labiata*, *Cattleya walkeriana* e *Cattleya brevicaulis* durante 120 dias. As sementes foram obtidas do Banco de Sementes de Orquídeas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UNOESTE. Foi realizado o cultivo *in vitro* das espécies com meio de cultura MS à meia concentração contendo variações das seguintes vitaminas: para tiamina as concentrações foram 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹, para piridoxina e nicotinamida foram utilizadas as concentrações 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg L⁻¹. Foram avaliados parâmetros de crescimento por meio de massa fresca parcial, massa seca final, o comprimento de plântulas: de parte aérea e de raiz, e o número de brotos para cada uma das espécies. As vitaminas do complexo B testadas, tiamina (B₁), nicotinamida (B₃) e piridoxina (B₆) apresentaram efeito isoladamente na cultura de plântulas de orquídeas. Recomenda-se reduzir a dosagem de tiamina para 0,025 mg L⁻¹, diminuir a dosagem de piridoxina para 0,125 mg L⁻¹ e não acrescentar nicotinamida em nenhuma concentração no meio.

Palavras-chave: Ácido nicotínico, Orquídeas, Piridoxina, Tiamina.

ABSTRACT

***In vitro* development of *Cattleyas* under different vitamins concentration**

Vitamins belong to a group of organic nutrients. They are essential in small quantities to life performing several functions in the metabolism and as antioxidants or resistance inducers. The lack of vitamins may cause many developmental and metabolic problems, as well as the excess may also be toxic. However, the use of an appropriate dose is necessary. The limited number of studies on the topic relative to orchids justified the need for this work, which aimed to evaluate the influence of B vitamins, Thiamin (B₁), Nicotinamide (B₃) and Pyridoxine (B₆) on the development and seedling growth of *Cattleya labiata*, *Cattleya walkeriana* and *Cattleya brevicaulis* during 120 days. The seeds were obtained from UNOESTE Orchid Seedbank. In the Tissue Culture Lab at UNOESTE the experiment was carried out in *in vitro* half strength MS medium for seedling growth; with the variations in the vitamins: 0.025; 0.05; 0.1 and 0.2 mg L⁻¹ for Thiamine, and 0.125; 0.25; 0.5 and 1 mg L⁻¹ for Pyridoxine and Nicotinamide. The increment in the fresh weight at each 30 days, dry weight at the end, shoot and root length and the number of shoots and roots parameters were evaluated. The assayed complex B vitamins, thiamine, nicotinamide and pyridoxine exhibited isolate effects in orchid seedling growth. It is recommended to reduce the thiamine dosage to 0.025 mg L⁻¹, decrease the dosage of pyridoxine to 0.125 mg L⁻¹, and do not add nicotinamide in any concentration in the medium.

Keywords: Nicotinic Acid, Orchid, Pyridoxine, Thiamine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variações de vitaminas do complexo B (tiamina, nicotinamida e piridoxina) e as respectivas concentrações utilizadas.....	19
Tabela 2 -	Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para <i>Cattleya labiata</i>	23
Tabela 3 -	Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca de <i>Cattleya labiata</i> cultivados por 120 dias.....	25
Tabela 4 -	Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para <i>Cattleya walkeriana</i>	27
Tabela 5 -	Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca de <i>Cattleya walkeriana</i> cultivados por 120 dias.....	29
Tabela 6 -	Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para <i>Cattleya brevicaulis</i>	31
Tabela 7 -	Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca <i>Cattleya brevicaulis</i> cultivados por 120 dias.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Orquídeas	11
2.2	Vitaminas	13
2.2.1	Glicina	14
2.2.2	Mio-inositol	14
2.2.3	Tiamina	14
2.2.4	Piridoxina	15
2.2.5	Ácido nicotínico	16
3	OBJETIVO	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Material biológico	18
4.2	Germinação	18
4.3	Crescimento	18
4.4	Avaliação de comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, número de brotos e raízes	20
4.5	Avaliação de massa fresca	20
4.6	Determinação de massa seca	20
4.7	Análise estatística	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	Comportamento de plântulas de <i>Cattleya labiata</i>	22
5.2	Comportamento de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i>	25
5.3	Comportamento de plântulas de <i>Cattleya brevicaulis</i>	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO A – MODIFICAÇÃO DO MEIO MS...	41

1 INTRODUÇÃO

Orquídeas são cultivadas há muito tempo pela sua beleza e em alguns casos pelas suas propriedades medicinais. Contudo, o extrativismo, seja pelas flores, seja para o uso das plantas ou suas partes como medicação e alimentos, e a ocupação humana de diversos ambientes, bem como alterações climáticas têm ameaçado diversas espécies e mesmo populações inteiras destas plantas.

De acordo com Hew e Yong (2014) as orquídeas são plantas de crescimento lento na natureza, ou mesmo em cultivo apresentando um metabolismo CAM/C3 (Crassulaceae acid metabolism/ C3 metabolism) para a maioria das espécies. Algumas poucas espécies apresentam metabolismo C3 exclusivo e nenhuma apresenta metabolismo C4, o que as torna bastante lentas em crescimento. São plantas altamente especializadas, apresentando uma simbiose muito grande com fungos nas raízes, ocupando nichos ecológicos específicos e sementes muito pequenas com dispersão, na maioria das espécies, pelo vento. Estas sementes podem germinar em água, mas só se desenvolvem com o auxílio das micorrizas.

O cultivo de orquídeas tropicais sempre foi considerado um luxo, exatamente pela dificuldade em se obterem variantes destas plantas. Todavia, a partir do começo do século XX, o cultivo *in vitro*, por meio de sementes ou de clonagem, se tornou uma realidade, disponibilizando grandes quantidades destas plantas e atendendo a uma forte demanda do mercado floricultor. O gênero americano *Cattleya* e seus híbridos são bastante valorizados neste mercado por apresentarem flores grandes e em todos os matizes de colorido.

Todavia, apesar de serem comumente utilizadas, pouco se sabe sobre o efeito das vitaminas, e de suas concentrações, nos meios de cultura existentes. As formulações dos meios são bastante variáveis o que pode alterar a velocidade de crescimento para estas plantas, que por serem originadas de sementes pequenas e terem um metabolismo tipo CAM ou C3 apresentam um crescimento bastante lento. Assim, a alteração nos componentes orgânicos dos meios de cultura, como as vitaminas pode acelerar o crescimento e a disponibilização de plantas adultas para o mercado. Levando-se em conta que estas plantas podem demorar de quatro a seis anos para serem comercializadas, pequenos ganhos de tempo em cada fase do

ciclo podem representar um ganho final bastante importante para este tipo de cultura.

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das vitaminas do complexo B, Tiamina (B_1), Nicotinamida (B_3) e Piridoxina ou (B_6) no desenvolvimento e crescimento de plântulas das orquídeas *Cattleya labiata*, *Cattleya walkeriana* e *Cattleya brevicaulis* durante 120 dias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estimam-se que existem entre 20.000 a 35.000 espécies de orquídeas, sendo elas o maior grupo em número de espécies entre as angiospermas, distribuídas em 736 gêneros (CHASE et al., 2015) e ocorrendo em quase todos os ecossistemas da Terra, embora seja mais abundante e diversificada em florestas tropicais (NIKISHINA et al., 2001). No entanto, cerca de 2.499 espécies estão presentes no Brasil, das quais, 1.600 são endêmicas deste país (FORZZA et al., 2013). Espécies como os gêneros de *Cattleyas*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium* entre outras, e seus híbridos, apresentam alto valor ornamental e também com grande importância econômica, sendo comercializadas em mudas envasadas, juvenis ou floridas (JUDD et al., 2009). Também com expressiva importância econômica é a orquídea *Vanilla planifolia*, de cujas cápsulas maduras, obtêm-se a especiaria comercializada como baunilha, muito utilizada na gastronomia.

No Brasil, no ano de 2013, 10,7 milhões de dólares foram movimentados com a importação de 14,069 milhões de mudas de orquídeas (SUZUKI, 2014). Devido a intensa exploração de orquídeas tem acarretado a extinção de algumas espécies, seja pela degradação do seu habitat natural ou para comercialização dessa planta (HOSOMI et al., 2011). Todavia, é indispensável a utilização de métodos de conservação e preservação *in situ* e *ex situ* para a família Orquidácea, podendo ser com o auxílio de bancos de sementes, viveiro de mudas e replantação das plantas no seu habitat natural em áreas preservadas.

2.1 Orquídeas

A família Orquidácea é pertencente as angiospermas e classificada como monocotiledônea, caracterizando-se por apresentar flores, geralmente vistosas para atrair polinizadores e hermafroditas, porém, em alguns gêneros podem ser encontradas flores exclusivamente femininas ou masculinas. São plantas herbáceas, perenes, terrícolas ou, mais comumente encontradas como plantas epífitas, representando 73% das espécies (RODRIGUES; BARROS, 2011).

Suas flores podem apresentar variados tamanhos, que vão desde alguns milímetros para mais de vinte centímetros, com colorações que vão desde o transparentes até tons de verde, rosa, azul, amarelo, vermelho ou até mesmo

escuras, como algumas plantas que apresentam flores pretas. Frequentemente, as flores são zigomórficas, com 3 sépalas e 3 pétalas, sendo uma delas diferenciada ou expandida, denominada labelo, com função para atrair e guiar o polinizador. O androceu pode ser constituído de até 3 estames, conforme cada subfamília. Na sua grande maioria, os grãos de pólen encontram-se aglutinados em massas cerosas denominadas políneas, encontradas em números de 2, 4, 6 ou 8. Os frutos são capsulares e quase secos, raramente carnosos. Já as sementes são numerosas, minúsculas, com embrião rudimentar e desprovidas de endosperma (RODRIGUES; BARROS, 2011).

Na natureza, a germinação das sementes de orquídeas está em uma associação de mutualismo com fungos micorrízicos, devido ao diminuto tamanho das sementes e a pequena reserva nutricional (YAM et al., 2009), no qual, as orquídeas fornecem compostos orgânicos aos fungos e estes fornecem nutrientes para a germinação do vegetal (ANDRONOVA, 2003; GALDIANO JÚNIOR et al., 2010, RASMUSSEN, 2011; MAHENDRAN et al., 2013). Em virtude disso, muitas espécies apresentam baixo sucesso reprodutivo ou habitat restrito, portanto, é indispensável à conservação e ao cultivo *in vitro* das sementes das orquídeas com meios de cultura sintéticos, assemelhando-se aos nutrientes fornecidos pelos fungos para favorecer a germinação das espécies (GALDIANO JÚNIOR et al., 2010; RASMUSSEN, 2011; MAHENDRAN et al., 2013).

Cattleya labiata é uma espécie epífita, também encontrada como rupícola principalmente na Caatinga e Mata Atlântica, nos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Foi descrita e classificada por John Lindley, em 1821. Esta planta atualmente está vulnerável de acordo com a Lista Vermelha das espécies ameaçadas de extinção da IUCN (International Union for Conservation of Nature) (FORZZA et al., 2013).

Cattleya walkeriana é uma planta encontrada na Mata Atlântica e Cerrado brasileiro nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, e Tocantins. Planta epífita ou rupícola, encontrada sempre próxima de rios, lagos ou pântanos. Foi descoberta por Gardner em 1839, próximo ao rio São Francisco, em Minas Gerais. Também encontra-se vulnerável de acordo com o grau de ameaça da Lista Vermelha da IUCN (FORZZA et al., 2013).

Cattleya brevicaulis foi descrita por (H. G. Jones) van den Berg, é uma planta epífita encontrada em regiões de Mata Atlântica, principalmente nos estados

de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (FORZZA et al., 2013). Esta espécie ainda não apresentam dados suficientes para determinar o grau de ameaça de extinção.

2.2 Vitaminas

Vários orgânicos complexos como polpas de frutas, extrato de malte, água de coco tem sido utilizados para incrementar o crescimento de cultura in vitro por fornecerem diversas substâncias como vitaminas, açúcares ou fito hormônios (GNASEKARAN et al., 2010, ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011).

As vitaminas, são essenciais em pequenas quantidades a qualquer ser vivo, desempenhando funções, sobretudo, como cofator no metabolismo e atuando como antioxidantes, protegendo o organismo contra a ação dos radicais livres, atrasando ou inibindo a oxidação de um substrato oxidável. No entanto, com as plantas também não é diferente, pois elas também necessitam de uma dosagem ideal de tais nutrientes. Muitos seres vivos conseguem produzir suas próprias vitaminas, no entanto, essa quantidade pode não ser adequada, necessitando de uma suplementação externa. A carência das vitaminas pode acarretar diversos problemas de desenvolvimento e metabolismo, assim como o excesso também pode ser tóxico ao ser vivo (HENDLER, 1994).

Algumas plantas, fungos e bactérias tem a capacidade de biossíntese de suas próprias vitaminas, com exceção da vitamina B₁₂ (VANDERSCHUREN et al., 2013). Muitas vitaminas, como a tiamina, piridoxina e ácido nicotínico podem ser encontradas de forma natural, como no leite de coco, extrato de levedo ou de malte, suco de frutas, no extrato de batata e em cereais, podendo ser acrescentados no meio de cultura ou diretamente nas plantas para enriquecimento nutricional e crescimento do vegetal (GNASEKARAN et al., 2010; ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011; MOLNÁR; VIRÁG; ÖRDÖG, 2011).

Na composição de um meio de cultura sintético para crescimento de plantas as vitaminas mais comumente utilizadas são a tiamina (B₁), piridoxina (B₆) e ácido nicotínico (B₃), porém, não existe um consenso sobre quais vitaminas são de fato essenciais. Além destas três vitaminas, outros componentes muito utilizado em meios de cultura são o mio-inositol e a glicina (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

2.2.1 Glicina

O aminoácido glicina é produzida através de outro aminoácido, denominada serina, cuja enzima responsável pela reação é a serina hidroximetiltransferase. Conforme Ashraf e Foolad (2005), a glicina aparece em resposta a situações de estresse por desidratação, podendo ocorrer em diversas espécies vegetais, como beterraba (*Beta vulgaris*), espinafre (*Spinacia oleracea*), cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) e sorgo (*Sorghum bicolor*).

2.2.2 Mio-inositol

Considerado por alguns autores como um carboidrato suplementar pela capacidade de síntese no próprio organismo e como vitamina do complexo B para outros, o mio-inositol mostrou-se essencial para o crescimento da levedura, em muitas células de mamíferos e em brotos vegetais, o qual uma pequena quantidade estimulou a divisão celular dos brotos. Alguns tecidos conseguem se desenvolver na ausência do mio-inositol, porém, com a aplicação desta vitamina em uma pequena quantidade é suficiente para a estimulação da divisão celular (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

2.2.3 Tiamina

Tiamina tem sido associada com diversos fatores fisiológicos e serve como cofator em diversas reações enzimáticas (GOYER, 2010), em especial na via glicolítica, na via das pentoses fosfato, no Ciclo dos ácidos tricarboxílicos e na biossíntese de aminoácidos (ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011), sendo que a piruvato descarboxilase é fundamental para a produção de energia (KURSTEINER; DUPUIS; KUHLEMEIER, 2003). Adição externa de tiamina pode propiciar uma maior habilidade em tolerar estresses abióticos por aumentar a capacidade de suprir NADH ou NADPH (TUNC-OZDEMIR, 2009) e neste caso ligados também a um maior fornecimento de nicotinamida.

Quando aplicada em brotos de girassol (SAYED; GADALLAH, 2002), e em raízes de tomate (WHITE, 1937) apresentou resultados para proteção do

sistema radicular em resposta ao estresse salino sofrido pela planta, além de outros fatores abióticos, como contra o estresse oxidativo, funcionando como coenzima (OERTLI, 1987) Girassol tratado com tiamina (GOYER, 2010), quando submetido a estresse salino apresentou maior teor relativo de água, mais clorofila, menor potencial de água nas folhas e mais açúcares solúveis em comparação com plantas não tratadas.

2.2.4 Piridoxina

As plantas, fungos e bactérias podem fazer a biossíntese da piridoxina (SZYDLOWSKI et al., 2013; O'NEIL et al., 2012; VANDERSCHUREN et al., 2013) a qual também é conhecida como vitamina B₆ sendo um cofator para mais de 140 reações químicas na célula, agindo na biossíntese de glucosinolatos e biossíntese e degradação de alguns hormônios vegetais, como auxina e etileno (MOONEY; HELLMAN, 2010).

É uma vitamina diretamente originada da via das Pentoses fosfato e Glutamina via transaminação (TAMBASCO-STUDART et al., 2005, 2007) e também envolvida em tolerância a estresses (RASCHKE et al., 2011) sendo que a falta desta ocasiona sensibilidade a alta luminosidade e ao estresse foto-oxidativo (HAVAUX et al., 2009) e adição desta pode melhorar a germinação de plantas oleaginosas como girassol, cártamo e colza (DOLATABADIAN; SANAVY, 2008). De acordo com Denslow, Walls e Draub (2005), a piridoxina mostrou-se como um importante antioxidante para as plantas, por interferir com os mecanismos contra patógenos, atuando como coenzima em descarboxilação, racemização e transaminação de aminoácidos (OERTLI, 1987). Em plantas deficientes em B₆ houve a hipersensibilidade ao estresse oxidativo causado por fatores abióticos, como seca e radiação UV, enquanto que em plantas com elevadas concentrações desta vitamina mostraram resistência ao estresse (CHEN; XIONG, 2005; HAVAUX et al., 2009; MIRET; MUNNÉ-BOSCH, 2014).

Transgênicos de *Arabidopsis* mostraram que essa planta aumenta os níveis de piridoxina quando exposta à radiação ultravioleta para combater o estresse oxidativo e as plantas de *Arabidopsis* com níveis inferiores de piridoxina

apresentaram desenvolvimento prejudicado e floração tardia em relação aos acessos selvagens (VANDERSCHUREN et al., 2013).

2.2.5 Ácido nicotínico

Outra importante vitamina do complexo B é a B₃, também conhecida por niacina, ácido nicotínico ou nicotinamida, a qual tem sido descrita como precursora de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) as quais são aceptoras de elétrons nas reações da via pentoses-fosfato, β -oxidação de lipídeos e na cadeia respiratória, nas reações de oxirredução celulares e como transportadores de energia (ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011; MIRET; MUNNÉ-BOSCH, 2014) ou como atenuadores de estresse salino (AZZOOZ, 2004; BASSUONY et al., 2008; HASSANEIN et al., 2009; SADAK et al., 2010; ABDELHAMID et al., 2013)

Em situações de estresse para a planta como seca, alta luminosidade ou calor excessivo é liberada a produção desta vitamina para produção de mais energia para a planta (MIRET; MUNNÉ-BOSCH, 2014).

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das vitaminas do complexo B, tiamina (B₁), ácido nicotínico (B₃) e piridoxina (B₆) no desenvolvimento e crescimento *in vitro* inicial de plântulas das orquídeas brasileiras *Cattleya labiata*, *Cattleya walkeriana* e *Cattleya brevicaulis* durante 120 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais na Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, em Presidente Prudente/SP.

No experimento foram utilizadas plântulas de *Cattleya labiata* (Lindl, 1821), *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) e *Cattleya brevicaulis* (H.G. Jones) van den Berg, cujas sementes foram obtidas por polinização cruzada entre plantas diferentes e estocadas no Banco de Sementes de Orquídeas da UNOESTE. Todas as espécies utilizadas são endêmicas do Brasil, sendo que *Cattleya labiata* e *Cattleya walkeriana* estão ameaçadas de extinção devido a destruição do seu habitat natural e comercialização das plantas.

4.2 Germinação

A germinação foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura sólido MS à meia concentração com o pH ajustado para em 5,7, contendo 20g/L de sacarose e 10 g/L de ágar. Antes da semeadura, as sementes foram desinfetadas com uma solução de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC; 5 g/L) contendo 100µl de Tween 80, por 10 minutos. As sementes foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e dispensadas nas placas com meio. A semeadura foi realizada em uma capela de fluxo laminar de acordo com Machado Neto e Custódio (2005). Quatro placas foram usadas por espécie, seladas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento, com temperatura controlada em $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo regulado automaticamente para 16h.

4.3 Crescimento

Após a germinação e crescimento inicial, as plântulas foram divididas e transferidas para meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) à meia concentração (ver **Anexo A**) de todos os nutrientes contendo 30 g/L de sacarose, 10 g/L de ágar e com pH ajustado para 5,7. As vitaminas foram avaliadas isoladamente em diferentes

concentrações para os respectivos tratamentos conforme Tabela 1 e mantiveram-se as concentrações do mio-inositol e da glicina (meia concentração de MS) em todas as variações. Utilizaram-se 7 repetições com 5 plantas em cada frasco de cada tratamento por 120 dias. Também foram utilizadas testemunhas e controle. Para as testemunhas foram utilizadas meio MS normal com todos os sais, exceto tiamina, piridoxina e nicotinamida. Para o controle foram utilizados meio MS normal todas as vitaminas à meia concentração com 0,05 mg L⁻¹ de tiamina, 0,25 mg L⁻¹ de piridoxina e 0,25 mg L⁻¹ de nicotinamida. No total, foram utilizados 14 meios de cultura diferentes, sendo eles: testemunha sem nenhuma vitamina; o controle com todas as vitaminas à meia dose; e concentrações isoladas de tiamina, piridoxina e nicotinamida conforme a Tabela 1. Em todos os meios de cultura foram adicionados 1 mg L⁻¹ de glicina e 50 mg L⁻¹ de mio-inositol normalmente.

Tabela 1 – Variações de vitaminas do complexo B (tiamina, nicotinamida e piridoxina) e as respectivas concentrações utilizadas.

Tratamentos	Concentração de vitaminas (mg L ⁻¹)		
	B ₁	B ₃	B ₆
Testemunha	0	0	0
Controle	0,05	0,25	0,25
Meio 1	0,025	0	0
Meio 2	0,05	0	0
Meio 3	0,1	0	0
Meio 4	0,2	0	0
Meio 5	0	0,125	0
Meio 6	0	0,25	0
Meio 7	0	0,5	0
Meio 8	0	1	0
Meio 9	0	0	0,125
Meio 10	0	0	0,25
Meio 11	0	0	0,5
Meio 12	0	0	1

Fonte: O autor.

Todos meios foram fundidos, distribuídos em alíquotas de 50 mL em frascos de vidro e autoclavados por 20 minutos à 121 °C e 1 atm de pressão acima da pressão atmosféricas.

As plântulas de *C. labiata* e *C. walkeriana* estavam com três meses após a germinação, enquanto que *C. brevicaulis* estavam com cinco meses após a germinação.

Foram avaliados inicialmente massa fresca, massa seca, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, número de brotos e números de raízes. Ao final do experimento também foram feitas as mesmas avaliações.

4.4 Avaliação de comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, número de brotos e raízes

Com o auxílio de um paquímetro graduado em milímetros foi realizada a medição do comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea inicial e final. A contagem da quantidade de brotos e quantidade de raízes inicial e final foi verificada manualmente, planta por planta efetuada a comparação com as medidas finais.

4.5 Avaliação de massa fresca

Para a avaliação de massa fresca foram utilizadas pinças de inox desinfetadas por flambagem e balança eletrônica de precisão da marca GEHAKA modelo BG 440 com três casas decimais dentro da câmara de fluxo laminar e desinfetadas com álcool 70%. A cada 30 dias, as plântulas foram e pesadas e passadas para frascos com meio de cultura novo.

4.6 Determinação de massa seca

Após as últimas pesagens, foi procedida a secagem das plantas em sacos de papel fino por 24 horas em estufa microprocessada de secagem, com temperatura controlada a 65°C e circulação forçada de ar, para posteriormente, ser mensurada a massa seca de cada plântula por frasco na balança eletrônica de precisão da marca SHIMADZU modelo AUW220D com precisão de 0,01mg, comparando com os resultados de massa seca inicial.

4.7 Análise estatística

O experimento foi delineado como inteiramente ao acaso. Para cada vitamina foram avaliadas 5 concentrações. Foi utilizado um controle contendo todas as vitaminas à meia concentração. Todos os dados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e as médias comparadas pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade. Quando aplicável foi realizada a regressão polinomial dos dados. Para a análise utilizou-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comportamento de plântulas de *Cattleya labiata*

Não houve diferença entre o controle, o zero e as concentrações de tiamina no crescimento de plântulas de *Cattleya labiata* (Tabela 2).

Para piridoxina houve efeito de dose aos 90 e 120 dias. A dose normalmente utilizada ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$), presente tanto no controle como no tratamento com a vitamina isolada, não diferiu estatisticamente, da metade da dose ($0,125 \text{ mg L}^{-1}$), sendo esta numericamente superior (Tabela 2). A maior dose (1 mg L^{-1}) foi estatisticamente diferente, apresentando um desempenho inferior mas não diferente do Zero.

Enquanto as maiores doses, aparentemente, apresentaram efeito inibidor com resultado estatisticamente igual ao observado na ausência da vitamina nicotinamida. Para nicotinamida a meia dose ($0,125 \text{ mg L}^{-1}$), a dose completa ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) e o controle, também foram iguais estatisticamente, todavia, a vitamina isolada na dose padrão, foi numericamente superior as outras duas (Tabela 2).

Todas as vitaminas apresentaram efeitos cumulativos e crescentes ao longo do tempo estudado, o que pode ser observado pelas regressões, que foram todas significativas (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para *Cattleya labiata*

Dose (mg L ⁻¹)	Tempo (dias)					Regressão	R ²	
	0	30	60	90	120			
Zero	0,0197 a a a	0,0331 a a a	0,0424 a a a	0,0645 a b a	0,1040 a c b	L ₁	0,920**	
Tiamina	0,025	0,0197a	0,0210a	0,0382a	0,0577a	0,0832a	L ₂	0,992**
	0,05	0,0197a	0,0217a	0,0446a	0,0758a	0,1136a	L ₃	0,967**
	0,1	0,0197a	0,0210a	0,0341a	0,0604a	0,0894a	L ₄	0,9109
	0,2	0,0197a	0,0222a	0,0366a	0,0664a	0,0955a	L ₅	0,941**
CV%	30,24							
Piridoxina	0,125	0,0197a	0,0547a	0,0926a	0,1395a	0,1928a	L ₆	0,992**
	0,25	0,0197 a	0,0361a	0,0517a	0,0780ab	0,1143ab	L ₇	0,967**
	0,5	0,0197 a	0,0190a	0,0295a	0,0462ab	0,0660bc	L ₈	0,9109
	1,0	0,0197 a	0,0217a	0,0343a	0,0534ab	0,0701c	L ₉	0,941**
CV%	38,47							
Nicotinamida	0,125	0,0197a	0,0338a	0,0605a	0,0823a	0,1101 ab	L ₁₀	0,954**
	0,25	0,0197 a	0,0217a	0,0446a	0,0901a	0,1314a	Q ₁	0,998*
	0,5	0,0197 a	0,0216a	0,0360a	0,0641a	0,0951c	Q ₂	0,998*
	1,0	0,0197 a	0,0222a	0,0366a	0,0664a	0,0955 bc	Q ₃	0,996*
CV%	37,76							
Controle	0,0197 a a a	0,0275 a a a	0,0483 a a a	0,0883 a ab a	0,1210 a ab ab	Q ₄	0,989*	

Letras diferentes na coluna: tipo normal = tiamina, itálico = piridoxina e negrito = nicotinamida. Regressão: L = Linear; Q = Quadrática. L₁ = 0,000667x – 0,0127; L₂ = 0,00144x – 0,0136; L₃ = 0,00771 – 0,0137; L₄ = 0,0121x + 0,0003; L₅ = 0,00044x + 0,0133; L₆ = 0,00144x – 0,0136; L₇ = 0,00771 – 0,0137; L₈ = 0,0121x + 0,0003; L₉ = 0,00044x + 0,0133; L₁₀ = 0,000529x + 0,0093; Q₁ = 0,000006x² – 0,00015x + 0,0144; Q₂ = 0,000005x² – 0,00068x + 0,0152; Q₃ = 0,00005x² – 0,00011x + 0,0150; Q₄ = 0,000006x² + 0,0024x + 0,0137. Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: O autor.

Para *Cattleya labiata*, nas variáveis, comprimento da maior raiz, número de raízes, número de brotos e massa seca não houve diferença estatística entre os tratamentos com as diferentes dosagens de tiamina. No entanto, em comprimento de parte aérea, a dose zero mostrou-se numericamente inferior aos outros tratamentos dessa vitamina (Tabela 3).

Os melhores resultados encontrados para *C. labiata* com relação à piridoxina foram com $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os parâmetros avaliados. Para massa seca foi estatisticamente diferente de todos os outros. Para as variáveis de comprimento (raiz e parte aérea) não diferiu do controle, nem da dose comumente utilizada no laboratório ($0,15 \text{ mg L}^{-1}$), testada de maneira isolada. Para as variáveis de números (brotos e raízes) também não diferiu da ausência da vitamina (Tabela 3).

O uso de nicotinamida para *C. labiata*, nas variáveis de comprimento e número de raízes, bem como a matéria seca não apresentaram diferenças significativas. Para comprimento da parte aérea, apenas o controle e a dose de $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ foram diferentes estatisticamente. O número de brotos não apresentou diferenças estatísticas entre o controle, a dose zero e a dose de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca de *Cattleya labiata* cultivados por 120 dias

	Número de raízes	Número de brotos	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento da parte aérea (mm)	Massa seca (g)
Tiamina (mg L ⁻¹)					
0	3,43 a	3,93 a	15,33 a	6,80 b	0,0097 a
0,025	3,57 a	3,47 a	16,33 a	7,93 ab	0,0096 a
0,05	3,23 a	3,23 a	17,43 a	9,36 a	0,0116 a
0,1	3,53 a	3,87 a	18,20 a	8,90 ab	0,0115 a
0,2	4,33 a	3,37 a	20,90 a	8,50 ab	0,0132 a
Controle*	3,46 a	3,50 a	18,77 a	8,13 ab	0,0113 a
Piridoxina (mg L ⁻¹)					
0	3,43 abc	3,93 ab	15,33 bc	6,80 c	0,0097 b
0,125	4,90 a	4,60 a	22,07 a	9,33 a	0,0179 a
0,25	4,05 ab	3,87 ab	18,81 ab	9,08 ab	0,0122 b
0,5	2,32 c	2,60 b	15,56 bc	7,48 bc	0,0070 b
1	2,93 bc	2,77 b	13,17 c	7,00 c	0,0076 b
Controle*	3,47 abc	3,50 ab	18,77 ab	8,13 abc	0,0113 b
Nicotinamida (mg L ⁻¹)					
0	3,43 a	3,93 a	15,33 a	6,80 ab	0,0097 a
0,125	3,47 a	2,53 b	15,87 a	6,33 b	0,0079 a
0,25	3,27 a	2,97 ab	17,83 a	7,07 ab	0,0111 a
0,5	2,90 a	2,63 b	15,60 a	6,73 ab	0,0082 a
1	3,24 a	2,56 b	18,04 a	7,08 ab	0,0099 a
Controle*	3,47 a	3,50 a	18,77 a	8,13 a	0,0113 a

* - Controle – corresponde ao Meio MS na dosagem recomendada contendo nicotinamida a 0,25 mg L⁻¹; Piridoxina a 0,25 mg L⁻¹; e Tiamina a 0,05 mg L⁻¹

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: O autor.

5.2 Comportamento de plântulas de *Cattleya walkeriana*

As plântulas de *C. walkeriana* apresentaram um maior acúmulo de massa fresca na concentração padrão de tiamina, isolada ou combinada com as outras no controle (Tabela 4).

Para piridoxina a melhor concentração foi de 1 mg L⁻¹, não diferindo porém de 0,5 mg L⁻¹ ou do controle. Nicotinamida teve um desempenho semelhante

em quase todos os tratamentos, sendo que a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e o zero foram iguais do controle (Tabela 4).

Houve resposta cumulativa e crescente ao longo do tempo estudado, para todos os tratamentos o que pode ser observado pelas regressões, que foram todas significativas (Tabela 4).

Tabela 4– Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para *Cattleya walkeriana*

Dose (mg L ⁻¹)	Tempo					Regressão	R ²
	0	30	60	90	120		
Zero	0,0120aaa	0,0182aa	0,0385aa	0,0512bba	0,1339bbb	Q1	0,953**
Tiamina	0,025	0,0120a	0,0268a	0,0397 ^a	0,0690ab	Q2	0,978**
	0,05	0,0120a	0,0310a	0,0524 ^a	0,0923ab	Q3	0,982**
	0,1	0,0120a	0,0283a	0,0452 ^a	0,0694a	L1	0,917*
	0,2	0,0120a	0,0269a	0,0457 ^a	0,0559ab	L2	0,881**
CV%	40,49						
Piridoxina	0,125	0,0120a	0,0226 a	0,0631 a	0,1027 a	Q4	0,972*
	0,25	0,0120a	0,0248 a	0,0352 a	0,0622ab	Q5	0,977**
	0,5	0,0120a	0,0251 a	0,0468 a	0,0824ab	Q6	0,984**
	1,0	0,0120a	0,0327 a	0,0511 a	0,0869ab	Q6	0,975**
CV%	38,49						
Nicotinamida	0,125	0,0120a	0,0357a	0,0509 a	0,0737 a	Q7	0,957**
	0,25	0,0120a	0,0278a	0,0425 a	0,0737 a	Q8	0,973**
	0,5	0,0120a	0,0291a	0,0490 a	0,0838 a	L4	0,943**
	1,0	0,0120a	0,0261a	0,0488 a	0,0716 a	Q9	0,968**
CV%	35,04						
Controle	0,0120aaa	0,0237aa	0,0357a a	0,0682ababa	0,1920aaa	Q10	0,960**

Letras diferentes na coluna tipo normal - tiamina, *itálico* - piridoxina e **negrito** - nicotinamida. Regressão: L= Linear; Q = Quadrática. $L_1 = 0.000012x^2 - 0.0005x + 0.0162$; $Q_2 = 0.000011x^2 - 0.0003x + 0.0167$; $Q_3 = 0.000015x^2 - 0.00035x + 0.0177$; $L_1 = 0.0009x + 0.0023$, $L_2 = 0.0008x + 0.0039$; $L_3 = 0.0011x + 0.0003$; $Q_4 = 0.000010x^2 - 0.00033x + 0.0658$; $Q_5 = 0.000014x^2 - 0.00039x + 0.0165$; $Q_6 = 0.000014x^2 - 0.00035x + 0.0184$; $Q_7 = 0.000011x^2 - 0.00017x + 0.0188$; $Q_8 = 0.000014x^2 - 0.00044x + 0.0179$; $L_4 = 0.0010x + 0.0126$; $Q_9 = 0.000012x^2 - 0.00033x + 0.0170$; $Q_{10} = 0.000019x^2 - 0.0010x + 0.0204$. Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: O autor.

Em plântulas de *C. walkeriana*, não houve diferenças significativas para as variáveis número de brotos e de raízes em qualquer concentração de tiamina. Para comprimento de raízes, a concentração padrão ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) de tiamina mostrou-se estatisticamente superior ao zero (ausência da vitamina) e o crescimento de parte aérea foi diferente estatisticamente na dose zero (ausência da vitamina) e a dose mais elevada ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Em comprimento da parte aérea, a dose de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de tiamina foi superior aos outros tratamentos com a mesma vitamina. Para a variável massa seca apenas a ausência (zero) e o controle diferiram estatisticamente. (Tabela 5).

Piridoxina, em diferentes concentrações, não afetou o comprimento da parte aérea, a massa seca e o número de brotos (Tabela 5) em plântulas de *C. walkeriana*. O comprimento de raízes foi estatisticamente diferente entre o dobro da concentração utilizada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) ou nas mais baixas ($0,125$ ou zero mg L^{-1}) (Tabela 5). Para o número de raízes o dobro da concentração utilizada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) diferiu do controle (todas as vitaminas) e do zero. Em número de brotos, todos os resultados foram estatisticamente iguais.

O uso de diferentes concentrações de nicotinamida em plântulas de *C. walkeriana* não apresentou qualquer efeito sobre o comprimento da parte aérea. Para o comprimento de raízes as concentrações de $0,125$; $0,25$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ forma estatisticamente diferentes apenas do zero (ausência de vitaminas). Houve diferença estatística entre a concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e o zero. Para o número de brotos o controle foi estatisticamente diferente de qualquer concentração de nicotinamida. Para massa seca o controle (todas as vitaminas) e a concentração maior (1 mg L^{-1}) foram estatisticamente superiores apenas à ausência de vitaminas (zero) (Tabela 5).

Tabela 4 - Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca de *Cattleya walkeriana* cultivados por 120 dias

	Número de raízes	Número de brotos	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento da parte aérea (mm)	Massa seca (g)
Tiamina (mg L⁻¹)					
0	2,67 a	3,30 a	9,72 b	6,90 bc	0,0109 b
0,025	3,13 a	4,23 a	12,12 ab	8,63 ab	0,0147 ab
0,05	4,15 a	3,16 a	13,79 a	8,94 a	0,0143 ab
0,1	3,57 a	3,60 a	11,30 ab	8,00 abc	0,0130 ab
0,2	3,93 a	3,67 a	11,80 ab	6,30 c	0,0123 ab
Controle*	2,95 a	5,36 a	11,43 ab	7,13 ab	0,0177 a
Piridoxina (mg L⁻¹)					
0	2,67 c	3,30 a	9,72 c	6,90 a	0,0109 a
0,125	3,96 abc	5,60 a	11,08 bc	7,32 a	0,0208 a
0,25	4,73 ab	2,83 a	13,57 ab	7,40 a	0,0142 a
0,5	4,87 a	4,97 a	14,27 a	8,50 a	0,0164 a
1	4,57 abc	4,53 a	11,83 abc	7,13 a	0,0180 a
Controle*	2,95 bc	5,36 a	11,43 abc	7,13 a	0,0177a
Nicotinamida (mg L⁻¹)					
0	2,67 b	3,30 b	9,72 b	6,90 a	0,0100 b
0,125	4,63 ab	3,37 b	13,97 a	7,03 a	0,0150 ab
0,25	4,90 a	3,40 b	13,53 a	7,60 a	0,0133 ab
0,5	4,13 ab	3,30 b	14,10 a	7,20 a	0,0133 ab
1	4,70 ab	3,43 b	12,93 ab	6,47 a	0,0183 a
Controle*	2,95 ab	5,36 a	11,43 ab	7,13 a	0,0200 a

* - Controle – corresponde ao Meio MS na dosagem recomendada contendo nicotinamida a 0,25 mg L⁻¹; Piridoxina a 0,25 mg L⁻¹; e Tiamina a 0,05 mg L⁻¹

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: O autor.

5.3 Comportamento de plântulas de *Cattleya brevicaulis*

Para as plântulas de *C. brevicaulis* os maiores acúmulos de massa fresca nos tratamentos com tiamina se observaram nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ não diferindo contudo da concentração de 0,05 mg L⁻¹.

Para piridoxina o tratamento de 0,125 mg L⁻¹ não diferiu do tratamento com 1 mg L⁻¹ mas foi estatisticamente diferente dos demais.

Em se considerando a nicotinamida isoladamente, as concentrações de 0,125 mg L⁻¹ e 0,25 mg L⁻¹ não diferiram entre si e a concentração de 0,5 mg L⁻¹, mas diferiram dos demais (Tabela 6).

Houve resposta crescente e cumulativa ao longo do tempo para todos os tratamentos o que pode ser observado pelas regressões, lineares ou quadráticas, as quais foram todas significativas (Tabela 6).

Tabela 5 – Efeito de concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida na massa fresca em gramas de plântulas ao longo dos 120 dias para *Cattleya brevicaulis*

Dose (mg L ⁻¹)	Tempo					Regressão	R ²
	0	30	60	90	120		
Zero	0,0913aaa	0,0302bbb	0,0333ccb	0,0367ccb	0,0478ccd	Q ₁	0,845**
Tiamina	0,025	0,0913a	0,0667ab	0,0871b	0,1131ab	Q ₂	0,941*
	0,05	0,0913a	0,0729ab	0,1095ab	0,1222ab	Q ₃	0,942*
	0,1	0,0913a	0,1000a	0,1418a	0,1448ab	L ₁	0,929**
	0,2	0,0913a	0,1085a	0,1488a	0,1575a	L ₂	0,962**
CV%	27,86						
Piridoxina	0,125	0,0913a	0,0792ab	0,1607a	0,1676a	L ₃	0,876**
	0,25	0,0913a	0,0559ab	0,0966abc	0,1124ab	L ₄	0,597**
	0,5	0,0913a	0,0458ab	0,0743bc	0,0794bc	Q ₄	0,734*
	1,0	0,0913a	0,1061a	0,1330ab	0,1394ab	L ₅	0,976**
CV%	41,49						
Nicotinamida	0,125	0,0913a	0,0700ab	0,1133a	0,1333a	Q ₅	0,965**
	0,25	0,0913a	0,0683ab	0,1250a	0,1417a	Q ₆	0,949**
	0,5	0,0913a	0,0567ab	0,0883a	0,1067a	Q ₆	0,964**
	1,0	0,0913a	0,0817a	0,1017a	0,1117a	Q ₈	0,968**
CV%	27,75						
Controle	0,0913aaa	0,0745ababab	0,0863bbca	0,1016babca	0,1325bbc	Q ₉	0,981*

Letras diferentes na coluna tipo normal - tiamina, itálico - piridoxina e negrito - nicotinamida. Regressão: L= Linear; Q = Quadrática. Q₁ = 0.000012x² - 0.0005x + 0.0162; Q₂ = 0.000009x² - 0.00058x + 0.0866; Q₃ = 0.000009x² - 0.00034x + 0.0873; L₁ = 0.00082x + 0.0847; L₂ = 0.00092x + 0.0870; L₃ = 0.0011x + 0.0761; L₄ = 0.00046x + 0.0701; Q₄ = 0.00001x² - 0.00096x + 0.0842; L₅ = 0.00060x + 0.0907; Q₅ = 0.000014x² - 0.00067x + 0.0886; Q₆ = 0.000014x² - 0.00056x + 0.0874; Q₇ = 0.000017x² - 0.00128x + 0.0890; Q₈ = 0.000008x² - 0.00044x + 0.0911; Q₉ = 0.000008x² - 0.00058x + 0.0895. Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: O autor.

O uso de diferentes concentrações de tiamina não afetou o comprimento da raiz de plântulas de *C. brevicaulis*. Para a variável comprimento da parte aérea, a ausência (concentração zero) e as concentrações 0,05 e 0,2 mg L⁻¹ não diferiram entre si. A ausência de tiamina foi vantajosa para comprimento da parte aérea. Para o número de raízes o controle foi estatisticamente inferior a todos os outros tratamentos, mas para número de brotos apenas a maior concentração foi diferente estatisticamente. Considerando a variável massa seca as concentrações de 0,2, 0,1 mg L⁻¹ ou o zero não diferiram entre si (Tabela 7).

O uso de diferentes concentrações de piridoxina não afetou o acúmulo de massa seca em plântulas de *C. brevicaulis*. O comprimento da maior raiz teve o controle como o resultado inferior aos demais tratamentos. Para comprimento da parte aérea, a concentração zero (ausência de vitamina) e 0,125 mg L⁻¹ foram diferentes estatisticamente apenas da concentração 0,25 mg L⁻¹. Para a variável número de raízes a concentração de 1,0 mg L⁻¹ diferiu apenas do controle e da concentração de 0,25 mg L⁻¹. Para a variável número de brotos, a concentração zero (ausência de vitaminas), 0,125 mg L⁻¹ e o controle não diferiram estatisticamente (Tabela 7).

Plântulas de *C. brevicaulis* expostas a diferentes concentrações de nicotinamida não diferiram estatisticamente para comprimento de parte aérea e para massa seca. O uso isolado de nicotinamida, em qualquer concentração foi diferente estatisticamente do controle (todas as vitaminas) para o comprimento da maior raiz e o número de raízes. Para número de brotos, a concentração de 0,25 mg L⁻¹ foi estatisticamente diferente de 1,0 mg L⁻¹, mas não diferiu das demais (Tabela 7).

Tabela 6 - Efeito de diferentes concentrações de tiamina, piridoxina e nicotinamida sobre as variáveis comprimento da maior raiz e da parte aérea, número de brotos e de raízes e da massa seca *Cattleya brevicaulis* cultivados por 120 dias

	Número de raízes	Número de brotos	Comprimento de raiz (mm)	Comprimento de parte aérea (mm)	Massa seca (g)
Tiamina (mg L ⁻¹)					
0	4,00 ab	5,73 a	10,57 a	27,23 a	0,0233 ab
0,025	3,67 ab	5,00 a	10,80 a	18,00 bc	0,0167 b
0,05	3,37 ab	5,60 a	9,53 a	20,07 abc	0,0200 b
0,1	3,60 ab	4,80 ab	12,40 a	17,37 c	0,0217 ab
0,2	4,60 a	3,43 b	12,57 a	25,77 ab	0,0317 a
Controle*	3,00 b	4,90 a	9,20 a	17,07 c	0,0200 b
Piridoxina (mg L ⁻¹)					
0	4,00 ab	5,73 a	27,23 ab	10,57 a	0,0246 a
0,125	3,47 ab	5,00 ab	25,87 ab	10,23 a	0,0245 a
0,25	3,09 b	3,63 c	24,06 ab	7,17 b	0,0169 a
0,5	3,27 ab	3,06 c	23,01 ab	8,63 ab	0,0149 a
1	4,23 a	3,73 bc	33,50 a	8,20 ab	0,0246 a
Controle*	3,00 b	4,90 ab	17,07 b	9,20 ab	0,0197 a
Nicotinamida (mg L ⁻¹)					
0	4,00 ab	5,73 ab	27,23 a	10,57 a	0,0246 a
0,125	5,59 a	5,71 ab	29,96 a	8,69 a	0,0240 a
0,25	4,90 a	6,33 a	27,23 a	8,63 a	0,0230 a
0,5	5,53 a	4,63 ab	28,13 a	9,43 a	0,0241 a
1	4,94 a	4,33 b	31,50 a	8,52 a	0,0246 a
Controle*	3,00 b	4,90 ab	17,07 b	9,20 a	0,0198 a

* - Controle – corresponde ao Meio MS na dosagem recomendada contendo nicotinamida a 0,25 mg L⁻¹; Piridoxina a 0,25 mg L⁻¹; e Tiamina a 0,05 mg L⁻¹

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Para Goyer (2010), a vitamina B1 ou tiamina está associada com diversos fatores fisiológicos em seres vivos, atuando como cofator em reações enzimáticas para a produção de energia (KURSTEINER; DUPUIS; KUHLEMEIER, 2003). Adição externa de tiamina pode propiciar uma maior habilidade em tolerar estresses abióticos por aumentar a capacidade de suprir NADH ou NADPH (TUNC-OZDEMIR, 2009) e neste caso ligados também a um maior fornecimento de nicotinamida.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que o efeito de diferentes concentrações de tiamina foi reduzido, sendo que a concentração de uso do laboratório ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$, metade da concentração utilizada no meio MS) para cultivo de orquídeas esteve entre as mais adequadas para o acúmulo de massa fresca nas três espécies estudadas. Para as variáveis de contagem (número de brotos e de raízes) apenas *C. brevicaulis* apresentou resposta, neste caso, negativa à maior concentração de tiamina ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$).

Todavia, para as variáveis de comprimento e massa seca, houve respostas diferenciadas de cada espécie, sendo que à exceção de *C. brevicaulis*, para massa seca, houve uma tendência em se manter a dose de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ como uma das mais efetivas. A adição desta vitamina, contudo, tem provado incrementar as capacidades de crescimento (PUSHPALATHA et al., 2011) em outras espécies e inclusive as capacidades de resistência a doenças (AHN; KIM; LEE., 2005; PUSHPALATHA et al., 2011) em cultura de tecidos, todavia, é controverso e pode acarretar desde indução até a inibição do crescimento de calos, raízes e embriões (ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011).

Piridoxina é um importante cofator que está envolvido em muitos eventos metabólicos dos vegetais como tolerância (RASCHKE et al., 2011) ou susceptibilidade a estresse (DENSLOW et al., 2005; DOLATABADIAN; SANAVY, 2008; HAVAUX et al., 2009). No presente trabalho, os dados indicam que concentrações menores (zero ou mesmo $0,125 \text{ mg L}^{-1}$) que as utilizadas rotineiramente no laboratório da UNOESTE ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) possam ser mais eficientes, em se considerando não apenas o acúmulo de matéria fresca, mas todas as variáveis analisadas. Isto pode indicar que estas plantas necessitam uma concentração muito baixa desta vitamina no meio. Como as condições de cultivo

foram semelhantes para todos os tratamentos não houve incremento em comprimento de raízes e parte aérea, número de raízes ou de brotos e massa seca.

Nicotinamida tem sido descrita como precursora de NAD e NADP, os quais participam ativamente das reações de oxirredução celulares e como transportadores de energia (ABRAHAMIAN; KANTHARAJAH, 2011) ou como atenuadores de estresse salino (AZZOOZ, 2004; BASSUONY et al., 2008; HASSANEIN et al., 2009; SADAK et al., 2010; ABDELHAMID et al., 2013). Desta maneira, um aumento na concentração de nicotinamida poderia aumentar o metabolismo e acelerar o crescimento e desenvolvimento das plantas, todavia os dados demonstram, de uma maneira geral, que altas concentrações não são responsivas ou não diferem das mais baixas, o que pode estar de acordo com Neill, Desikan e Hancock (2003) onde nicotinamida inibe o fechamento estomático induzido por ABA ou Óxido Nitroso (NO), o que poderia aumentar a taxa de respiração e diminuir o crescimento da planta. Se estes compostos são utilizados como transportadores de energia, estas moléculas são regeneráveis, durante os diversos ciclos metabólicos, corroborando os dados obtidos aqui, isto é, de que pequenas quantidades seriam necessárias para o crescimento e desenvolvimento destas plantas.

7 CONCLUSÕES

As vitaminas do complexo B, testadas, timina (B₁), nicotinamida (B₃) e piridoxina (B₆) apresentaram efeito isoladamente no crescimento de plântulas de orquídeas e o excesso destes compostos pode ter sido tóxico para as plantas, prejudicando seu crescimento e desenvolvimento.

No cultivo de *Cattleya labiata*, os melhores resultados foram encontrados com as dosagens de 0,025 mg L⁻¹ de tiamina, 0,125 mg L⁻¹ de piridoxina e sem o acréscimo de nicotinamida.

Para *Cattleya walkeriana*, os melhores resultados foram encontrados com 0,025 mg L⁻¹ de tiamina, 0,25 mg L⁻¹ de piridoxina e 0,125 mg L⁻¹ de nicotinamida.

No entanto, para *Cattleya brevicaulis*, os melhores resultados foram encontrados sem a adição de nenhuma vitamina, utilizando apenas os meios com glicina e mio-inositol na sua composição.

Analisando as espécies estudadas, um meio de cultura que atenda todas as necessidades biológicas das plantas recomenda-se reduzir a dosagem de tiamina para 0,025 mg L⁻¹, diminuir a dosagem de piridoxina para 0,125 mg L⁻¹ e não acrescentar nicotinamida em nenhuma concentração no meio.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, M. T. et al. Interactive effects of salinity stress and nicotinamide on physiological and biochemical parameters of faba bean plant. **Acta Biológica Colombiana**, v.18, n.3, p.499-510, 2013.
- ABRAHAMIAN, P.; KANTHARAJAH, A. Effect of vitamins on in vitro organogenesis of plant. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 5, p. 669, 2011.
- AHN, I.P.; KIM S.; LEE, Y. H. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1505-1515, 2005.
- ANDRONOVA, E. V. *In situ* seed germination of *Dactylorhiza maculata* sl. (Orchidaceae). **Botanicheskii Zhurnal**, v. 88, p. 63-71, 2003.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R.V. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- AZZOOZ, M.M. Proteins, sugars and ion leakage as a selection criterion for the salt tolerance of three sorghum cultivars at seedling stage grown under NaCl and nicotinamide. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, p.27-35, 2004.
- BASSUONY, F.M. et al. Physiological effects of nicotinamide and ascorbic acid on *Zea mays* plant grown under salinity stress II-Changes in nitrogen constituent, protein profiles, protease enzyme and certain inorganic cations. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p.350-359, 2008.
- CHASE, M.W. et al. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p.151-174, 2015.
- CHEN, H.; XIONG, L. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. **The Plant Journal**, v.44, n.3, p.396-408, 2005.
- DENSLOW, S.; WALLS, A.A.; DRAUB, M.E. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamers during plant defense response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 66, p. 244-255, 2005.
- DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S.A.M.M. Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 36, n. 2, p. 61-66, 2008.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FORZZA, R. C. et al. **Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 12 Ago. 2016.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. et al. Morfologia do fruto, semente e propagação in vitro de *Caularthron bicornutum* (Orchidaceae). **Revista EPeQ Fafibe**, v. 1, p. 64-68, 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer: The Netherlands, 2008. p. 115-173.

GNASEKARAN, P. et al. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBS) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. **Journal of Phytology**, v.2, n.1, p. 029–033, 2010

GOYER, A. Thiamine in plants: Aspect of its metabolism and functions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1615-1624, 2010.

HASSANEIN, R.A. et al. Physiological effects of nicotinamide and ascorbic acid on *Zea mays* plant grown under salinity stress. 1-Changes in growth, some relevant metabolic activities and oxidative defense systems. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 72-81, 2009.

HAVAUX, M. et al. Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. **BMC Plant Biology**, n. 9, p.1-22, 2009.

HENDLER, S. S. **A enciclopédia de vitaminas e minerais**. 7. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1994.

HEW, C. S.; YONG, J. W. H. **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**. Danvers, MA: World Scientific Publishing, 2004.

HOSOMI, S. T. et al. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, n. 139, p. 178-189, 2011.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KURSTEINER, O.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. The pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 968-978, 2003.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTODIO, C. C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, n. 26, p. 316-317, 2005.

MAHENDRAN, G. et al. Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. **Acta Physiologica Plantarum**, v.35, p.829–840, 2013.

MIRET, J. A.; MUNNÉ-BOSCH, S. Plant amino acid-derived vitamins: biosynthesis and function. **Amino Acids**, v. 46, p. 809-824, 2014.

MOLNÁR, Z.; VIRÁG, E.; ÖRDÖG, V. Natural substances in tissue culture media of higher plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55, p. 123-127, 2011.

MOONEY, S.; HELLMAN, H. Vitamin B6: killing two birds with one stone? **Phytochemistry**, v. 71, p. 495-501, 2010.

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

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, v.159, p.11–35, 2003.

NIKISHINA, T.V. et al. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochem and Biophys**, n. 378, p. 231-233, 2001.

O'NEIL, C. E. et al. Food sources of energy and nutrients among adults in the US. **Nutrients**, v. 4, p. 2097-2120, 2012.

OERTLI, J.J. Exogenous application of vitamins as regulators of growth and development of plants – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 150, n. 6, p. 375-391, 1987.

PUSHPALATHA, H.G. et al. Thiamine seed treatment enhances *LOX* expression, promotes growth and induces downy mildew disease resistance in pearl millet. **Biologia Plantarum**, v. 55, n.3, p. 522-527, 2011.

RASCHKE, M. et al. Enhanced levels of vitamin B6 increase aerial organ size and positively affect stress tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.66, n.3, p.414-432, 2011.

RASMUSSEN, H. N. Methods of studying field germination and seedling physiology: present potential and drawbacks. **European Journal of Environmental Sciences**, v.1, n.2, p. 55–59, 2011.

RODRIGUES, V. T.; BARROS, F. Orchidaceae juss. **Aspectos morfológicos e taxonômicos**, 2011. Disponível em:
<<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br>>. Acesso em: 18 de abr. 2016.

SADAK, M. S. et al. Increasing sunflower salt tolerance using nicotinamide and α -tocopherol. **International Journal Academic Research**, v. 2, n. 4, p. 263-270, 2010.

SAYED, S. A.; GADALLAH. Effects of shoot and root application of thiamin on salt-stressed sunflower plants. **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 71-80, 2002.

SUZUKI, R. M. **Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil**. 2014. Disponível em:

<http://www.raibt.net.br/21raibt/cd/Resumos/Resumo21Raibt_006.pdf>. Acesso em 11 out. 2016.

SZYDLOWSKI, N. et al. Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 75, p. 40-52, 2013.

TAMBASCO-STUDART, M. et al. Functional analysis of PDX2 from *Arabidopsis*, a glutaminase involved in vitamin B6 biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 915-925, 2007.

TAMBASCO-STUDART, M. et al. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p.13687-13692, 2005.

TUNC-OZDEMIR, M. Thiamine confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 421-432, 2009.

VANDERSCHUREN, H. et al. Strategies for vitamin B6 biofortification of plants; a dual role as a micronutrient and a stress protectant. **Plant Science**, v. 4, p. 1-7, 2013.

WHITE, P. R. Vitamin B1 in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, v. 12, n. 3, p. 803-811, 1937.

YAM, T. W.; ARDITTI, J.; CAMERON, K. M. The Orchids Have Been a Splendid Sport — an alternative look at Charles Darwin's contribution to orchid biology. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 2128–2154, 2009.

ANEXO A

Modificação do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) nas concentrações dos sais utilizados por litro (meia concentração do original)

Solução	Sal (is)		Concentração (mg L ⁻¹)
MS1	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio	825
MS2	KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico	85
	KNO ₃	Nitrato de Potássio	950
MS3	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado	166,1
MS4	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado	90,3
	MnSO ₄	Sulfato de Manganês	8,45
MS5	Na ₂ EDTA	Etilenodiaminotetracético disódico	18,63
	FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato Ferroso	13,9
MS6	H ₃ BO ₃	Ácido Bórico	3,1
	CoCl ₂	Cloreto de cobalto	0,125
	CuSO ₄	Sulfato de cobre	0,125
	NaMoO ₄	Molibdato de sódio	0,125
	KI	Iodeto de Potássio	0,415
	ZnSO ₄	Sulfato de Zinco	4,3
MS7	Orgânicos		Concentração (mg L ⁻¹)
		Glicina	1,0
		Mio - Inositol	50,0
		Ácido nicotínico	0,25
		Piridoxina.HCL	0,25
		Tiamina	0,05