

Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea

Salts concentrations of medium Knudson C and gibberellic acid *in vitro* growth orchid plantlets

Joyce Dória Rodrigues Soares^I Aparecida Gomes de Araújo^{II} Moacir Pasqual^{III*}
Filipe Almendagna Rodrigues^{II} Franscinely Aparecida de Assis^{II}

RESUMO

Objetivou-se testar diferentes concentrações de sais do meio de cultura Knudson C e ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço e *Cattleya loddigesii*. Plântulas, oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0cm de comprimento, foram inoculadas em frascos com capacidade para 250cm³, contendo 60mL de meio de cultura Knudson C nas concentrações de 0; 50; 100 e 200% de sais minerais, acrescidos de GA₃ (0; 2,5; 5; 7,5; 10mg L⁻¹). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com irradiância em torno de 35µmolm⁻²s⁻¹, temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas. Ao final de 90 dias, observa-se que, para *Cattleya loddigesii*, o meio Knudson C a 200 %, promove maior crescimento *in vitro*, sendo que a adição de 2,5mg L⁻¹ de GA₃ é eficiente no incremento do número de folhas. Maior multiplicação é registrada em meio Knudson C na concentração original de seus sais (100%). Para *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, a concentração do meio Knudson C influencia o número de folhas (200% de sais) e brotos (50% de sais), mas não tem efeito no crescimento e biomassa. Não se verifica efeito do GA₃ no número de brotos, comprimento de parte aérea e matéria fresca para os dois genótipos.

Palavras-chave: *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, *Cattleya loddigesii*, micropropagação.

ABSTRACT

The aim of this research was to test different concentrations of culture medium Knudson C and gibberellic acid in the *in vitro* growth of *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço and *Cattleya loddigesii* plantlets. Seedlings deriving from *in vitro* germinated seeds with approximately 1,0cm length, were inoculated in bottles of 250cm³ containing

60mL of Knudson C culture medium at salts concentrations of 0; 50; 100 e 200%, and supplemented with 0; 2.5; 5; 7.5; 10mg L⁻¹ of GA. The cultures were maintained in growth room with a 35µmolm⁻²s⁻¹ irradiance, 16 hours photoperiod and 25±1°C of temperature. After 90 days, it is observed that the culture medium Knudson C 200% for *Cattleya loddigesii* promote better *in vitro* growth. The addition of GA₃ (2.5mg L⁻¹) is efficient in the number of leaves increment. Better *in vitro* multiplication is registered in Knudson C medium in the original concentration (100%). For *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, the concentration of Knudson C culture medium influences the number of leaves (salts 200%) and sprouts (salts 50%), but does not have effect in the growth and biomass. No effect of the GA₃ in number of sprouts, length of aerial part and fresh mass for the two genotypes was verified.

Key words: *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, *Cattleya loddigesii*, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae compõe 7% de todas as espécies do planeta. Considerando as plantas já catalogadas, essas constituem, aproximadamente, 35 mil espécies naturais, nas suas duas subfamílias, duas divisões, cinco tribos, duas séries, duas subséries, 85 subtribos e mais de 2.500 gêneros, sem contar a infinidade de híbridos, naturais e artificiais (ALTAFIN et al., 2002).

A espécie *Cattleya loddigesii* encontra-se localizada nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, em locais

^IDepartamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

^{II}Departamento de Agricultura, UFLA, Lavras, MG, Brasil. E-mail: mpasqual@ufla.br. *Autor para correspondência.

situados entre 500 e 900m de altitude. A referida espécie apresenta de três a seis flores, com 8 a 11cm de envergadura e com espata na base. Seu período de florescimento compreende do outono até a primavera. São plantas epífitas (raízes aéreas) de regiões elevadas e de matas com elevado grau de umidade (MILLER & WARREN, 1996; ARAUJO, 2004). O híbrido *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço pertence ao gênero *Hadrolaelia*, antes denominado *Laelia*. São plantas epífitas com pseudobulbos fusiformes, mais ou menos alongados, unifoliadas, com folhas elípticas e flores de labelo trilobado com oito políneas. São, predominantemente, encontradas na parte leste e sul do Brasil.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada em variedades que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala. Compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas com meio nutritivo artificial (PASQUAL, 2001). É uma importante ferramenta não só na genética e melhoramento de plantas como também pode auxiliar em inúmeras outras áreas da agricultura (RAMALHO et al., 1995), produzindo plantas de alta qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (GUERRA et al., 1999).

A grande importância da sementeira *in vitro* é a diminuição do tempo de produção dessas mudas, pois algumas espécies que atingem maturidade com o primeiro florescimento em cinco a sete anos, podem florescer com três a quatro anos de idade. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes, espécie-específicos (ALTAFIN et al., 2002).

A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores que determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Os reguladores de crescimento são substâncias que atuam em vários processos do desenvolvimento das plantas em baixas concentrações (CALDAS et al., 1998).

Para a propagação *in vitro* de orquídeas dos gêneros *Cattleya*, *Laelias*, *Laeliacattleya* e *Brassocattleya*, ARDITTI & ERNST (1992) sugerem os meios de cultura de KNUDSON C (1946) ou REINERT & MOHR (1967). ARAÚJO et al. (2006) trabalhando com a orquídea *Laelia tenebrosa*, testaram diferentes

concentrações de meio de cultura Knudson C e carvão ativado e obtiveram maior crescimento de plântulas com a adição de 2g L⁻¹ de carvão ativado e com metade da concentração de sais minerais e sacarose do meio, Knudson C. PEREIRA et al. (2003), estudando diferentes concentrações de sacarose e de sais minerais do meio MS, registraram maior comprimento da parte aérea em gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern) com a utilização de 15g L⁻¹ de sacarose e meio MS com 50% de sais minerais. NAVES et al. (2003), trabalhando com bromélia (*Nidularium fulgens*), obtiveram melhores resultados para explantes responsivos com a utilização de 50% de sais minerais do meio Knudson C.

Em alguns casos, o GA₃ pode não apresentar efeito ou inibir o desenvolvimento de plântulas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PAIVA et al., 1997). SILVA (2001) utilizou 10mg L⁻¹ de GA₃ em gloxínia (*S. speciosa*), registrando maior número de folhas e maior número de brotos. Efeito positivo de GA₃ foi observado em diferentes espécies como macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.], em que a concentração de 0,5mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou satisfatório crescimento dos explantes (DINIZ et al., 2003); maçã cv. 'Fuji' (CORREA et al. 1991) e mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) (LUZ et al. 1994). Entretanto, a adição de GA₃ ao meio de cultura não proporcionou incremento no tamanho e número de brotos novos em crisântemo (OLIVEIRA, 1994).

Objetivou-se determinar a dosagem de ácido giberélico e concentração de sais minerais do meio básico Knudson C, para que proporcionem melhor crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea das espécies *Cattleya loddigesii* e *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de orquídeas (*Cattleya loddigesii* e *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço), oriundas de autofecundação, foram inoculadas em meio Knudson C e, posteriormente, subcultivadas por duas vezes, a cada três meses, em meio Knudson C acrescido de 2g L⁻¹ de carvão ativado, para uniformização.

Cada frasco de 250cm³ continha 60mL do mesmo meio Knudson C, nas concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200% de sais minerais, e acrescido de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0mg L⁻¹ de ácido giberélico em todas combinações possíveis. A concentração de 20g L⁻¹ de sacarose foi mantida em todos os tratamentos. O meio teve seu pH ajustado para 5,7±0,1 e foi solidificado

com 0,5% de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C, 1atm, durante 20 minutos. Plântulas, desprovidas de raízes, obtidas após germinação *in vitro* de sementes foram utilizadas como explantes. Foram inoculados quatro explantes (plântulas) por frasco, com aproximadamente, 1,0cm de comprimento, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 35µmolm⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em um fatorial 5x5, com quatro repetições de um frasco cada uma, sendo realizado um experimento para cada um dos genótipos, os quais foram avaliados separadamente.

Decorridos 90 dias da instalação, o experimento foi avaliado através de: número de folhas e número de brotos, a partir de contagem; comprimento da parte aérea (cm), medido do colo até o ápice da plântula, com uso de papel milimetrado; matéria fresca de plântulas (g), peso efetuado em balança de precisão. Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial, empregando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2000), em nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

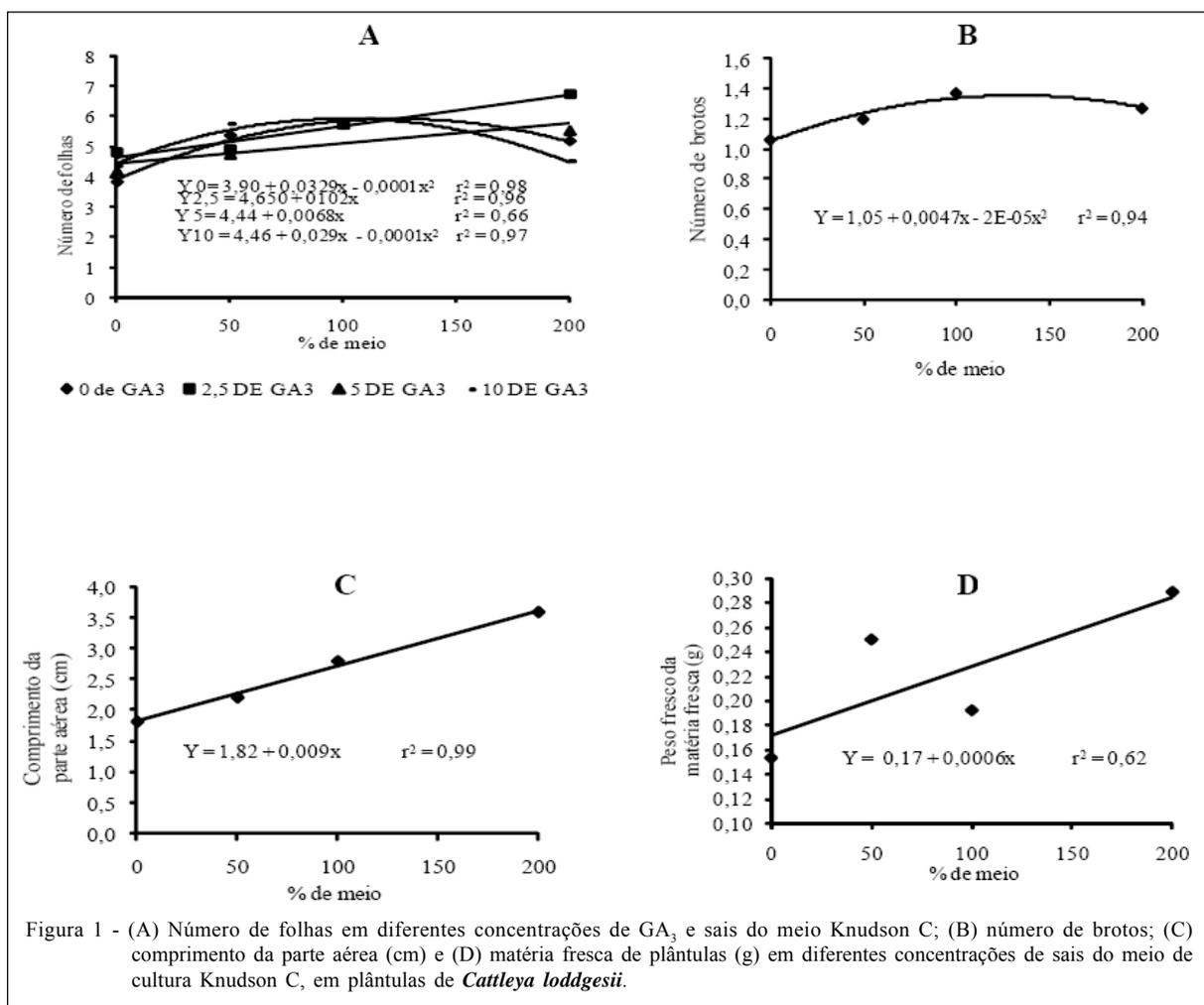
Em *Cattleya loddigesii*, houve interação significativa entre doses de GA₃ e concentração de sais do meio Knudson C, para número de folhas. A concentração de 2,5mg L⁻¹ de GA₃ combinada com a máxima concentração de sais testada (200%) proporcionou maior número de folhas (6,72) (Figura 1A). Esse resultado discorda dos obtidos por SILVA (2001), que, avaliando concentrações de BAP e GA₃, em gloxínia, obteve maior número de folhas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 10mg L⁻¹ de GA₃ e na ausência de BAP. Com essa mesma espécie, PEREIRA et al. (2003), trabalhando com concentrações de sais minerais do meio MS e de sacarose, observaram que 100% de sais de MS combinado com 60g L⁻¹ de sacarose apresentou melhores resultados para número de folhas e matéria fresca de plântulas.

Para *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, houve interação significativa entre as concentrações de meio e ausência de GA₃, obtendo-se maior número de folhas (5,4) com a utilização de 200% de sais minerais. (Figura 2A). Provavelmente, o híbrido

em questão, necessita de aumento da disponibilidade de nutrientes que é fornecida através do aumento na concentração do meio, ocasionando acréscimo no número de folhas. Discordando parcialmente deste, SILVA (2003), trabalhando com a orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya* Amber Glow, nas concentrações 0, 50, 100, 150 e 200%, em relação à original, obteve maior número de folhas (4,47) com a utilização de 118,6% de meio de cultivo Knudson C. O pequeno incremento no número de folhas dos genótipos de orquídea pode advir do fato de que o tempo de avaliação do experimento foi pequeno para verificar grandes variações.

A interação entre os fatores não foi significativa para números de brotos, registrando-se significância apenas para o fator porcentagem de meio, tanto para *Cattleya loddigesii* como para *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço. Maior número de brotos (1,37) de *C. loddigesii* foi obtido com a utilização de 100% de sais minerais do meio de cultivo (Figura 1B). NAVES et al. (2003), observaram que o número de brotos variou de 0,65 na concentração de 150% de meio de cultivo Knudson C, para 1,88 brotos na concentração original do meio MS. Verifica-se que o maior número de brotos (1,36) em *H. lobatta* x *H. purpurata* Aço foi obtido com a utilização de 50% de sais minerais do meio Knudson C (Figura 2B). Esses resultados concordam com SILVA (2003) que, trabalhando com gloxínia, obteve um número máximo de brotos (1,9), utilizando 50% de sais do mesmo meio. O pequeno efeito no número de brotos, promovido pela redução dos nutrientes do meio Knudson C, pode estar associado ao fato do ágar apresentar impurezas em sua composição como sais e resíduos de reguladores de crescimento, induzindo à morfogênese de brotos adventícios (PIERIK, 1987); devido às reservas existentes no explante, suficientes para iniciar o processo de formação de brotos, ou ainda, o aumento no teor de sais pode não ser adequado para produção de novas brotações.

Para *Cattleya loddigesii*, a variável comprimento médio da parte aérea apresentou significância apenas para o fator porcentagem de meio. Melhor resultado (3,6cm) foi obtido com a máxima concentração de sais do meio de cultura (200%). Incrementos nas doses de meio implicaram em maiores comprimentos para essa espécie (Figura 1C). CARLUCCI et al. (1980) afirmam que os gêneros *Cattleya* e *Laelia* são exigentes em zinco, o qual desempenha importante função no metabolismo de



crescimento da plântula. Esse fato pode explicar o maior desenvolvimento das plântulas de orquídea *C. loddigesii*, uma vez que a concentração final desse nutriente foi duplicada. Para a variável comprimento médio da parte aérea na espécie *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço não houve significância dos fatores isolados, nem da interação entre eles.

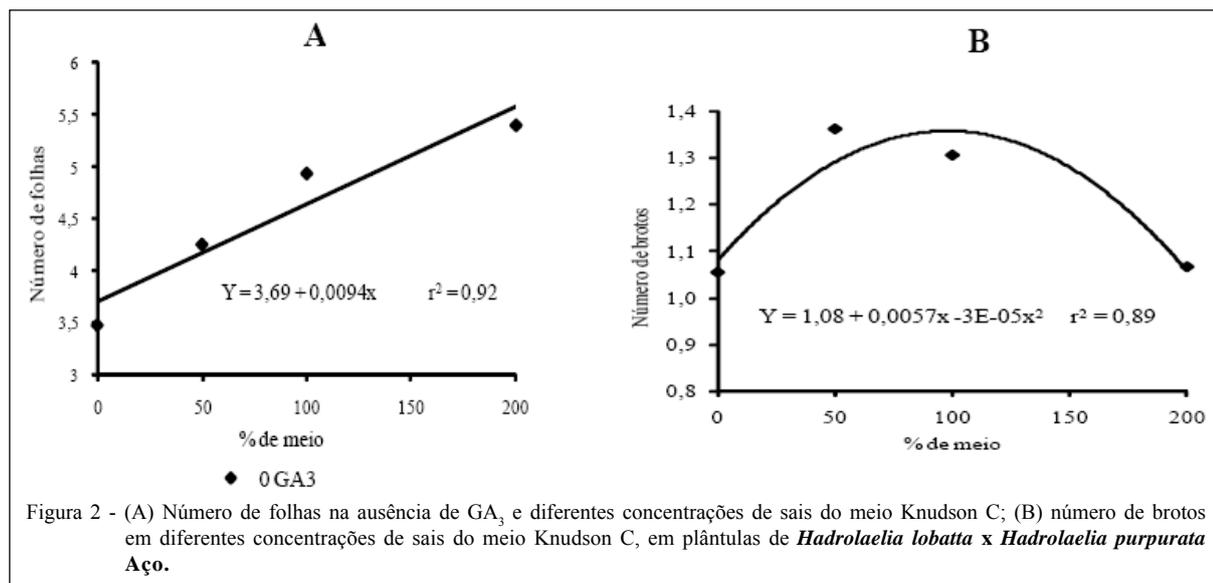
Não houve interação significativa entre os fatores avaliados para a variável matéria fresca em plântulas de *Cattleya loddigesii*. No entanto, o fator porcentagem de sais do meio de cultivo apresentou significância para a variável matéria fresca de plântulas. Maior matéria fresca de plântulas (0,289g) foi obtida com a utilização de 200% de meio de cultura Knudson C (Figura 1D), provavelmente, devido ao aumento da quantidade de nutrientes. Contrariando essas observações, ARAUJO et al. (2006) obteve maior matéria fresca de plântulas (0,144g) com a utilização de 50% de meio Knudson C, trabalhando com a orquídea

Laelia tenebrosa. Para a variável matéria fresca de plântulas, na orquídea *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, não houve significância dos fatores isolados, nem da interação entre eles.

CONCLUSÕES

Para *Cattleya loddigesii*, o meio Knudson C 200 % promoveu maior crescimento *in vitro*, sendo que a adição de 2,5mg L⁻¹ de GA₃ é eficiente no incremento do número de folhas. Maior multiplicação foi registrada em meio Knudson C na concentração original de seus sais (100%).

Em *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* Aço, a concentração do meio Knudson C influenciou o número de folhas (200% de sais) e brotos (50% de sais), mas não teve efeito no crescimento e biomassa. Não se verificou efeito do GA₃ no número de brotos, comprimento de parte aérea e matéria fresca para os dois genótipos.



REFERÊNCIAS

- ALTAFIN, V.L. et al. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal.** Espírito Santo do Pinhal: Unipinhal, 2003. 14p. (Boletim Técnico, 7).
- ARAÚJO, D. de. Cultivo de Orquídeas - *Cattleyas*, as mais belas orquídeas brasileiras. **Revista Brasileira Orquídeas**, v.8, p.18-26, 2004.
- ARAÚJO, A.G. et al. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.2, n.2, p.53-106, 2006.
- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids.** New York: John Wiley, 1992. 682p.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. p.87-132.
- CARLUCCI, M.V. et al. Nutrição mineral de plantas ornamentais - IX - Composição química e extração de nutrientes por 5 espécies de Orchidaceae. **O Solo**, v.72, n.1, p.27-34, 1980.
- CORREIA, D.M. et al. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftalenoacético na propagação *in vitro* de macieira 'Fuji'. **Ciência e Prática**, v.15 n.1, p.26-31, 1991.
- DINIZ, J.D.N. et al. Ácido giberélico (GA₃) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de Macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.4, p.934-938, 2003.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. V.1, p.183-260.
- GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34 n.9, p.1557-1563, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999000900005&lng=en&nrm=iso&tlang=pt. Doi: 10.1590/S0100-204X1999000900005.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, n.14, p.214-217, 1946.
- LUZ, J. M. Q. et al. Propagação *in vitro* de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Ciência e Prática**, v.18, n.4, p.399-402, 1994.
- MILLER, D.; WARREN, R. Orquídeas do Alto da Serra. **Salamandra Ltda**, v.1, p.200-228, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n.15, p.473-497, 1962.
- NAVES, V.C. et al. Avaliações de diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson C para a propagação *in vitro* de *Nidularium Fulgens* Lam. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., 2003; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras-MG: UFLA, 2003. p.229.
- OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tezlev.) cv. 'Orange Reagen'.** 1994. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

PAIVA, P.D.O. et al. Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, v.44, n.254, p.92-398, 1997.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: **Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV)**. Lavras:UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

PEREIRA, A.R. et al. Concentrações do meio de cultura e sacarose no crescimento *in vitro* de gloxínia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., 2003; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras, **Anais...** Lavras-MG: UFLA, 2003. p.260.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. **Martinus Nijhoff Publishers**, Boston, v.1, p.344, 1987.

RAMALHO, M. et al. **Genética na agropecuária**. 4.ed. São Paulo: Globo, 1995. 357p.

REINERT, R.A.; MOHR, H.C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, n.91, p.664-671, 1967.

SILVA, A.B. **Efeito de diferentes concentrações de BAP e GA3 na multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)**. 2001. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

SILVA, E.F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya* "Pastoral" x *Laeliocattleya* "Amber Glow"**. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.