

Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento *in vitro* em Híbridos de Orquídea

Milene Alves de Figueiredo¹, Fúlvia Maria dos Santos¹, Janaína de Oliveira Costa e Silva¹, Frederico Henrique Silva Costa² e Moacir Pasqual³

Introdução

A produção de orquídea tem se tornado um negócio de importante expressão na indústria da floricultura no mundo [8]. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas livres de doenças e pragas, além de propiciar a produção de um número significativo de novas mudas uniformes [4,3,15].

Novos clones de híbridos de orquídeas têm sido obtidos e selecionados anualmente por diferentes programas de cruzamento e propagação em massa através da cultura de tecidos utilizando meristemas apicais e laterais, e ápices de inflorescências como explantes [9,14].

O crescimento de células e a morfogênese de algumas espécies podem ser promovidos pelo aumento do nível de micronutrientes. George et al. [7] sugerem o meio Knudson C [10] para o cultivo e subcultivo de plântulas do gênero *Cattleya*, muito embora este meio apresente deficiência principalmente de micronutrientes.

Objetivou-se um bom crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de orquídea.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras. Como material vegetal foram utilizadas plântulas oriundas de germinação *in vitro* de sementes de três híbridos de orquídeas: (A) *LC. lisa ann* “magnificent maroon” x (*Cattleya chocolate drops kodama* x *BLC. hawaii galaxi* x *Golden tang*), o segundo híbrido (B) (*BC. pastoral innocence* x *Cattleya loddigesii*) x *LC. Luminosa* e o terceiro (C) *BLC. arrow gold* x *Pot. red crab*, e de uma planta selecionada de *Cattleya loddigesii* (D).

Utilizou-se meio de cultura Knudson C modificado (M) e normal (N) [5] acrescidos (P) ou não (A) de vitaminas, glicina e mio-inositol do meio MS [12]. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar. Foram inoculadas quatro plântulas com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes pequenas ($\pm 0,5$ cm) em frascos contendo 60 mL de meio. Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram

por 90 dias.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos e raízes, comprimento do sistema radicular, altura da parte aérea, massa fresca de plântulas. A análise de variância foi realizada utilizando software estatístico SISVAR pelo teste de médias Scott Knott.

Resultados e discussão

Melhores resultados para número de brotos foram obtidos quando os híbridos B e C foram empregados, enquanto que híbrido A e D apresentaram os piores resultados, em meio Knudson C Normal, na ausência de vitamina, glicina e mio-inositol (Figura 1). Pereira & Fortes [13] avaliando o estabelecimento de um protocolo para a multiplicação de batata (*Solanum tuberosum*) em meio de cultura líquido, constataram que a adição de ácido pantotênico (5,0 mg.L⁻¹) e tiamina (1,0 mg.L⁻¹) promoveram os melhores resultados na taxa de multiplicação. Contudo, cabe salientar que a concentração de tiamina no meio MS é 0,1 mg.L⁻¹, dez vezes menor que a utilizada por Pereira & Fortes [13].

Verifica-se para número de raízes, que o cultivo em meio Knudson C Normal e Modificado, sem vitaminas, glicina e mio-inositol de MS, apresentou os melhores resultados para os híbridos A, B e C (Figura 2). No híbrido A, o maior número de raízes foi observado com a utilização do meio Knudson C Normal acrescido de vitaminas, glicina e mio-inositol. Entretanto, os piores resultados foram constatados para o híbrido D, em meios modificado e normal com ausência de vitaminas, glicina e mio-inositol. De acordo com Figueiredo [5], maior número de raízes foi obtido na ausência de sulfato de zinco e manganês associado a 0,056 mg L⁻¹ e 2,8 mg L⁻¹ de ácido bórico respectivamente, confirmando o resultado obtido. Araújo [1], trabalhando com diferentes concentrações do meio Knudson C no crescimento *in vitro* de orquídeas, verificou que à medida que aumentaram as concentrações de meio KC, maiores quantidades de raízes foram formadas. Entretanto, a partir de 96,5% (0,054 mg L⁻¹ de H₃BO₃ e 0,319 mg L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O) do meio KC houve redução no número de raízes. Estes resultados estão de acordo com a afirmação citada anteriormente.

Para a variável altura da parte aérea (cm), os melhores resultados para o híbrido A, foram no meio

1. Aluna de Mestrado do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: migueiredo@yahoo.com.br

2. Aluno de Mestrado do Departamento de Agricultura, Setor de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000.

3. Professor Titular do Departamento de Agricultura, Setor de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000.

Apoio financeiro: CAPES e CNPq.

Knudson C Normal com e sem vitaminas, glicina e mio-inositol de MS e no meio Modificado com ausência de vitaminas, glicina e mio-inositol de MS. Para o híbrido B o melhor resultado foi o meio Knudson C Modificado com e sem vitaminas, glicina e mio-inositol de MS. Já os híbridos C e D apresentaram os menores resultados, independente do meio utilizado e da adição de vitaminas (Figura 3). Em outro estudo, verificou-se que maior altura de plântulas foi observada com 1,4 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 15,3 mg L⁻¹ de MnSO₄·4H₂O e 6,62 mg L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O [5], que corresponde ao meio modificado utilizado no atual trabalho. No trabalho com micropropagação de Crisântemos *in vitro*, Franco [6] afirmou que maior comprimento de plântulas é obtido com 12,4 mg L⁻¹ de H₃BO₃ e 17,2 mg L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O, o que demonstra a necessidade do aumento da disponibilidade desses nutrientes no meio de cultura para melhor crescimento de plântulas.

Quanto à massa fresca de plântulas, os meios estudados que apresentaram os melhores resultados foram o Knudson C Normal com vitaminas, glicina e mio-inositol para o híbrido A e o meio modificado sem vitaminas, glicina e mio-inositol para o híbrido B (Figura 4). Por outro lado, os piores resultados foram observados para o híbrido D, independente do meio empregado. Maior massa fresca de plântulas foi verificada por Figueiredo [5] com a utilização de 1,4 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 16,3 mg L⁻¹ de MnSO₄·4H₂O e 6,62 mg L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O. Já em outro estudo, menor peso de plântulas de orquídea foi obtido em meio Knudson C quando comparado a outros meios de cultura (MS e WPM). Isto implica a necessidade de se adequar o meio KC na micropropagação de orquídeas [1].

De acordo com os resultados acima observados, tornou-se claro a necessidade de se adequar para cada híbrido um meio de cultura, haja vista que o comportamento é influenciado pelo meio empregado. Estando portanto, em concordância com as afirmações de Krikorian [11], de que a presença de vitaminas ao meio de cultura influencia diretamente no crescimento e desenvolvimento dos cultivos, fato atribuído as funções catalíticas desempenhadas pelas mesmas.

As pesquisas envolvendo diferentes vitaminas parecem ser específicas para cada espécie e talvez para diferentes cultivares da mesma espécie, dependendo também do tipo de explante [2]. Além disso, o efeito benéfico da inclusão de determinada vitamina no meio de cultura dependerá, em grande parte, da capacidade de biossíntese de cada um nos tecidos ou órgãos cultivados. Ainda segundo estes autores, dos resultados já obtidos em estudos envolvendo o emprego de vitaminas, o que mais se destacou foi o efeito benéfico ou mesma a dependência absoluta de muitas culturas para a tiamina.

Conclusões

Para o híbrido A (*LC. lisa ann* “*maginificent maroon*” x (*C. chocolate drops kodama* x *BLC. hawaii galaxi* x *Golden tang*)), maior crescimento *in vitro* foi obtido em meio Knudson C normal com vitaminas, glicina e mio-inositol do meio MS. Para o híbrido B (*(BC. pastoral inocence* x *C. loddigesii)* x *LC. Luminosa*) melhor resultado foi obtido em meio Knudson C modificado sem vitaminas, glicina e mio-inositol do meio MS. Já para os híbridos C (*BLC. arrow gold* x *Pot. red crab*) e D (*Cattleya loddigesii*).

Referências

- [1] ARAUJO, A.G.de. 2004. *Crescimento in vitro e aclimatização de plântulas de orquídea*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 73p.
- [2] CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI, 2: 864.
- [3] DAMASCO, O.P.; GODWIN, I.D.; SMITH, M.K.; ADKINS, S.W. 1996. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36 (2): 237-241.
- [4] DREW, R.A.; SMITH, M.K. 1990. Field evaluation of tissue-cultured bananas in South-Eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30 (4): 569-574.
- [5] FIGUEIREDO, M.A. 2005. *Micropropagação de orquídeas do grupo Cattleya*. Monografia. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 40p.
- [6] FRANCO, J.C.C. 2004. *Micropropagação do crisântemo: ácido bórico e sulfato de zinco*. Monografia. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 21p.
- [7] GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. 1987. *Plant culture media: formulations and uses*. Edington: Exegetics, 1: 567.
- [8] GRIESBACH, R.J. 2002. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. In: Janick J, Whipkey A eds.), *Trends in New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, p.458-465.
- [9] HSU, C.C. 2003. *Protocorm-like body induction and plant regeneration from etiolated leaves of in vitro Phalaenopsis*. Master thesis, Institute of Tropical Agriculture and Intl Cooperation, Natl Pingtung Univ of Sci & Technol. 88p.
- [10] KNUDSON C, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 14: 214-217.
- [11] KRİKORIAN, A.D. 1991. Meios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.41-77.
- [12] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- [13] PEREIRA, J.E.S. & FORTES, G.R. de L. 2003. Protocolo para produção de material propagativo de bata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38 (9): 1035-1043.
- [14] TOKUHARA, K.; MII, M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*. 13: 7-11.
- [15] VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. 1996. Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). *HortScience*. 31 (5): 862- 865.

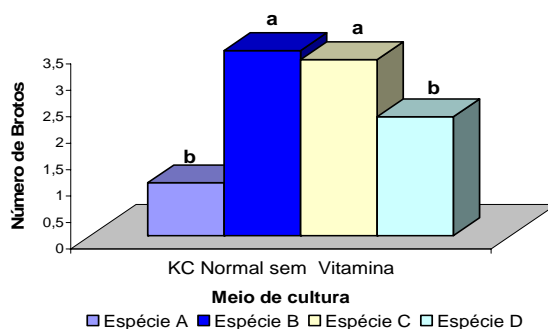


Figura 1. Número de brotações de diferentes híbridos de *Cattleya* spp. oriundos do cultivo *in vitro* em meio Knudson C Normal na ausência de vitaminas, glicina e mio-inositol de MS.

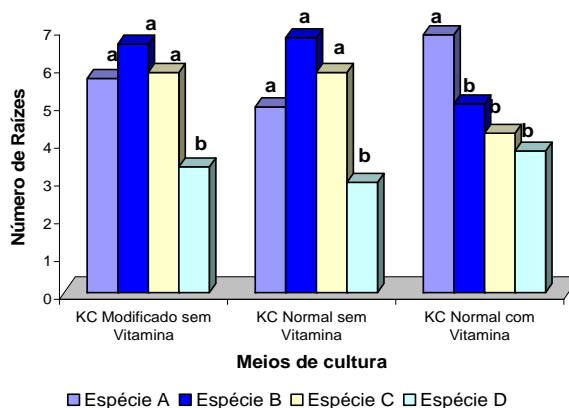


Figura 2. Número de raízes em diferentes híbridos de *Cattleya* spp. oriundos do cultivo *in vitro* em meio KC modificado e normal na ausência e presença de vitaminas, glicina e mio-inositol de MS.

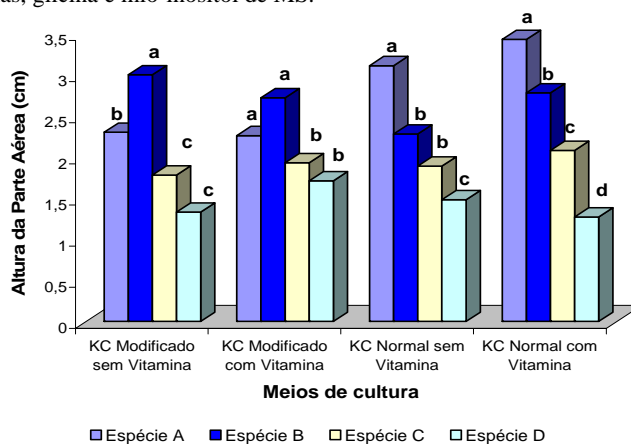


Figura 3. Altura da parte aérea em diferentes híbridos de *Cattleya* spp. oriundos do cultivo *in vitro* em meio KC modificado e normal na ausência e presença de vitaminas, glicina e mio-inositol de MS.

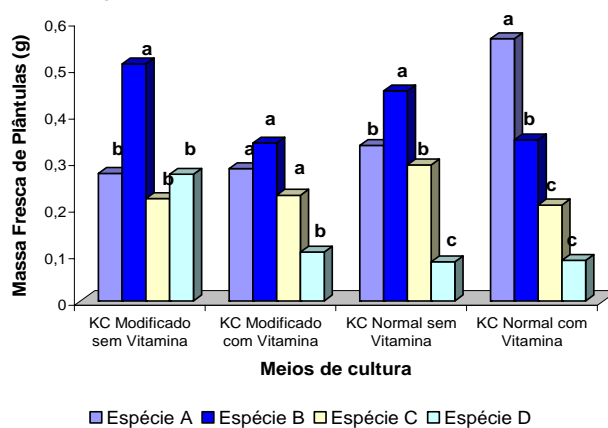


Figura 4. Massa fresca em diferentes híbridos de *Cattleya* spp. oriundos do cultivo *in vitro* em meio KC modificado e normal na ausência e presença de vitaminas, glicina e mio-inositol de MS.