

## Influência das vitaminas na propagação *in vitro* de *Cattleya* (Orchidaceae)

Vieira, José Geraldo Zaparolli<sup>1</sup>; Yamakami, Jorge Kaoro<sup>1</sup>; Faria, Ricardo Tadeu<sup>2</sup>; Aguiar, Ricardo Sfeir<sup>1</sup>; Assis, Adriane Marinho<sup>3</sup>; Unemoto, Lilian Keiko<sup>3</sup>; Rovaris, Sara Regina Silvestrin<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Mestrando em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina, PR; <sup>2</sup>Engº Agrº. Prof. Adjunto. Depto. Agronomia. UEL PR. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina PR. email: faria@uel.br ; <sup>3</sup>Doutoranda em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, PR.. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina, PR; <sup>4</sup>Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, PR. email: sara\_rsr@yahoo.com.br C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina, PR

### INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos é freqüentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993).

A cultura assimiótica ou sementeira *in vitro*, de orquídeas, constitui uma técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimiótica 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 (Willadino et al., 2001).

Os meios para cultura de tecidos podem variar muito, de acordo com a espécie a ser cultivada, fornecendo substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlando em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (George, 1996).

O meio nutritivo MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), é usado na cultura de tecidos para grande maioria das espécies e desde os primeiros estudos com cultura de raízes do tomateiro foi definida a mistura básica de vitaminas que é utilizada até hoje. Esta mistura consiste de tiamina (vitamina B<sup>1</sup>), ácido nicotínico (niacina), e piridoxina (vitamina B<sup>6</sup>), à qual normalmente se adiciona o aminoácido glicina. Estes compostos participam ativamente na biossíntese principalmente de aminoácidos e alcalóides (Caldas et al., 1998).

As vitaminas são compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. A vitamina mais comumente usada em cultura de tecidos é a tiamina (B<sup>1</sup>). A tiamina é solúvel em água e atua no metabolismo celular devido à função como coenzima na descarboxilação dos cetóácidos, como por exemplo o piruvato e cetoglutamato. O ácido nicotínico (niacina ou vitamina B<sup>3</sup>), é um componente das coenzimas NAD e NADP importantes na transferência de hidrogênio. A piridoxina, piridoxal e piridoxamina (complexo vitamínico B<sup>6</sup>), fazem parte de coenzimas metabólicas de aminoácidos que têm papel importante nas reações de transaminação e descarboxilação (George, 1996).

Os resultados das análises do crescimento *in vitro* em meio de cultura suplementado com diferentes vitaminas é muito particular para cada espécie vegetal, sendo que as suas concentrações podem influenciar no desenvolvimento das mesmas (Caldas et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adição de diferentes concentrações das vitaminas no desenvolvimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Cattleya*.

### MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas do cruzamento *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*, foram obtidas por sementeira *in vitro*, seguindo a metodologia descrita por Faria (1998).

As plântulas com altura média da parte aérea,  $1,0 \pm 0,5$  cm, foram subcultivadas nas seguintes concentrações de vitaminas: T<sup>1</sup> 0 g.L<sup>-1</sup>; T<sup>2</sup> 1 mL.L<sup>-1</sup>; T<sup>3</sup> 3 mL.L<sup>-1</sup>; T<sup>4</sup> 5 mL.L<sup>-1</sup>. As concentrações utilizadas no preparo da solução estoque de vitaminas foram: tiamina (0,10 g.100mL<sup>-1</sup>); ácido nicotínico (0,05 g.100mL<sup>-1</sup>) e a piridoxina (0,05 g.100mL<sup>-1</sup>), conforme formulação descrita por Murashige & Skoog, 1962.

O meio nutritivo utilizado foi o MS, 1962, modificado com metade da concentração dos macronutrientes e suplementado com 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O meio de cultura foi distribuído em frasco de 250 ml colocando-se 50 ml de meio de cultura por frasco. O meio foi solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de agar e o pH ajustado para 6 com solução de KOH, antes do processo de autoclavagem a 121° C, 1 atm por 20 minutos.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura média de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas luz e intensidade luminosa  $35 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

A avaliação foi feita após seis meses do início do experimento, dos seguintes parâmetros: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, número de brotações e massa fresca total. As mudas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remoção do meio nutritivo e foram aclimatizadas em bandejas de isopor contendo como substrato fibra de coco. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com 50% luminosidade, regadas manualmente diariamente e adubadas semanalmente com 3 g.L<sup>-1</sup> de adubo foliar NPK 06:06:08. A avaliação da porcentagem de sobrevivência das plantas na casa de vegetação foi realizada após seis meses do plantio nas bandejas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições contendo oito plantas por repetição.

Os dados foram submetidos à análise de variância, complementados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 demonstram que não houve diferenças significativas para todos os parâmetros avaliados, mostrando que a adição de vitaminas ao meio de cultura não foi benéfica para a propagação *in vitro* de *Catleya*.

As vitaminas são comumente utilizadas na formulação no meio Murashige & Skoog (1962), entretanto Linsmaier & Skoog (1965), demonstraram que apenas a tiamina foi essencial no crescimento de calo em fumo, numa concentração de 0,4 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que a piridoxina e ácido nicotínico podem ser supridas do meio de cultura.

**Tabela 1.** Valores médios de massa fresca total (MF), altura da parte aérea (APA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), número de brotações (NB) e taxa sobrevivência (TS), para o cruzamento de *C. labiata* X *C. forbesii*, após seis meses do início do experimento.

Dose de vitamina*	MF (g)	APA (cm)	CR (cm)	NR <sup>1</sup>	NB <sup>1</sup>	TS %
0	0,31 a2	3,29 a	3,83 a	2,27 a	1,25 a	100 a
1 mL.L-1**	0,37 a	3,40 a	2,71 a	2,27 a	1,10 a	100 a
2 mL.L-1**	0,35 a	2,83 a	3,73 a	2,44 a	1,51 a	100 a
3 mL.L-1**	0,34 a	3,27 a	3,63 a	2,40 a	1,17 a	100 a
<b>CV%</b>	<b>20,78</b>	<b>24,42</b>	<b>3,63 a</b>	<b>17,34</b>	<b>31,22</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> dados sob transformação raiz quadrada de y + 0,5.

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey no nível de 5%.

\* Formulação descrita por Murashige e Skoog, 1962.

\*\* Solução estoques de vitaminas.

Segundo (Murashige & Skoog, 1962), para algumas espécies cultivadas *in vitro*, há necessidade de aumentar a concentração das vitaminas ou até mesmo acrescentar

outros tipos de vitaminas à mistura padrão. Na cultura de tecidos de *Citrus* onde foram acrescentadas as vitaminas: ácido fólico, riboflavina, biotina e ácido ascórbico, foi observado resultados significativos nos meios nutritivos (Chaturvedi & Mitra, 1974).

Silva et al. (2005) trabalhando no cultivo *in vitro* de orquídeas dos gêneros *Cattleya*, *Laelia* e *Brassavala*, também não observaram resultados significativos para os parâmetros massa fresca total, altura da parte aérea e número de brotações utilizando vitaminas do meio Murashige & Skoog, 1962.

Steven et al. (1991) estudando a estabilização e utilização das vitaminas do meio MS, concluíram que as vitaminas não foram degradadas após serem autoclavadas, mas sim quando foram colocadas na presença da luz, sendo após 30 dias não mais detectadas. Esses autores relatam que o ácido nicotínico e a piridoxina foram completamente desnaturadas pela autoclavagem enquanto que a tiamina reduziu pela metade, após uma semana de exposição à luz. Esses resultados podem explicar o observado neste trabalho, pois as plantas de orquídeas foram mantidas na presença de luz para estimular o crescimento vegetativo e desta forma as vitaminas foram degradadas, não tendo demonstrado efeito significativo para os parâmetros avaliados, em nenhuma das doses utilizadas. Por outro lado, Caldas et al. (1998) concluíram que os resultados com diferentes vitaminas parecem ser muito particulares para cada espécie e talvez para diferentes cultivares da mesma espécie, dependendo do tipo de explante.

Com relação à porcentagem de sobrevivência durante a etapa de aclimatização todos os tratamentos apresentaram 100% de pegamento (Tabela 1).

## CONCLUSÃO

A suplementação de vitaminas no meio de cultura não demonstrou resultados benéficos na propagação *in vitro* de *Cattleya*, podendo ser suprimida do meio de cultura sem afetar a qualidade das mudas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tiamina, Ácido Nicotínico, Piridoxina, Orquídea.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: EMBRAPA - SPI/ CNPH, v.1, 1998. 864p.

CHATURVEDI, H., MITRA, G.C. Clonal propagation of Citrus from somatic callus. **HortScience**, v. 9, p. 118-120, 1974.

FARIA, R. T.; ILLG, R. D. **Orquídea *Dendrobium nobile***. IN: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais. Boletim Técnico, 174 Campinas. Instituto Agrônomo de Campinas, 1998. p. 34-36.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, Exegetics, Edington X , 1996, p 344 – 419.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 100-127, 1965.

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

SILVA, E.F.; VILLA, F. PASQUAL, M. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídeas In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2., 2005, Fortaleza. **Resumos...**Fortaleza.

STEVEN, R.H.; MUNETA, P.; AUGUSTIN, J.; LETOURNEAU, D. Stability and utilization of picloram, vitamins, and sucrose in a tissue culture medium. **Plant Cell.**, v.25, p. 45-48, 1991.

WILLADINO, L.; ALVES, G. D.;DONATO, V. M. T. S.; MARTINI, P. C. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira.** v.36, n.10, Brasília,. 2001.

---

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Araucária.