

CRESCIMENTO *in Vitro* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA ORIUNDAS DA HIBRIDAÇÃO ENTRE *Cattleya labiata* E *Laelia itambana*¹

Chrystiane Borges Fráguas²
Fabíola Villa²
Ana Valéria de Souza²
Moacir Pasqual³
Leonardo Ferreira Dutra⁴

RESUMO

O maior entrave no processo de micropropagação de orquídeas está relacionado ao tempo necessário para a produção de mudas a partir de espécies híbridas selecionadas e a obtenção de meio de cultura adequado para cada espécie. Objetivou-se identificar a melhor concentração do meio de cultura Knudson e de sacarose para o crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas de sementes do cruzamento entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. Plântulas com aproximadamente 1,5 cm de comprimento e desprovidas de raízes foram inoculadas em frascos de 250 ml de capacidade contendo 50 ml de meio de cultura Knudson (0, 50, 100, 150 e 200% da formulação original) e sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O meio foi acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após 90 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e 32 µM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, avaliaram-se comprimento da parte aérea, número de raízes e peso da matéria fresca da plântula. O meio de cultura Knudson, em sua concentração original (100%) com 20 g L⁻¹ de sacarose, proporciona crescimento satisfatório de plântulas de orquídea.

Palavras-chave: *Cattleya* spp., *Laelia* spp., micropropagação, sacarose, meio de cultura.

¹ Aceito para publicação em 09.05.2003.

² Mestre em Fitotecnia/UFLA.

³ Dep. de Agricultura/UFLA. Cx. P. 37. 37200-000 Lavras/MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

⁴ Bolsista Pós-Doutorando/CNPq.

ABSTRACT

GROWING *in Vitro* OF ORCHID PLANTLETS ORIGINATED FROM THE *Cattleya labiata* x *Laelia itambana* HYBRIDIZATION

The difficulty in the process of orchid micropropagation is related to the necessary time needed for the plant production from the selected hybrids and to obtaining appropriate culture medium to each species. This work aimed to identify the best concentration of Knudson culture medium and sucrose for the growing *in vitro* of orchid plantlets originated from seeds of the *Cattleya labiata* x *Laelia itambana* cross. Plantlets with approximately 1.5 cm length and without roots were inoculated in a bottle of 250 ml capacity with 50 ml of Knudson culture medium (0, 50, 100, 150 and 200% of original formulation) and sucrose (0, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹). To the medium was added 2 g L⁻¹ of activated charcoal, solidified with agar 6 g L⁻¹ and with pH adjusted to 5.8 before sterilization at 121°C and 1 atm for 20 min. After 90 days in a growing chamber with 16 hours of photoperiod and luminous intensity of 32 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the length of aerial part, root number and fresh matter weight of the plantlets were evaluated. The Knudson culture medium in its original concentration (100%) with sucrose (20 g L⁻¹) provides a satisfactory growing of orchid plantlets.

Key words: *Cattleya* spp., *Laelia* spp., micropropagation, sucrose, culture medium.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são consideradas as mais antigas espécies ornamentais. Pertencem à família Orchidaceae, a maior entre as monocotiledôneas e também entre as plantas ornamentais, com 600 a 800 gêneros e 25.000 a 35.000 espécies (7, 14, 15), totalizando 7% das plantas ornamentais do mundo (20).

São plantas herbáceas perenes, bastante diversificadas quanto ao tamanho, forma e cor das flores, e comercialmente cultivadas tanto para produção de plantas de corte como de vaso (18). Alguns gêneros com elevado valor econômico, como *Cattleya* e *Laelia*, são apreciados nos mercados brasileiro e internacional, evidenciando a potencialidade do País no cultivo de orquídeas (16).

A propagação de orquídeas pode ser tanto vegetativa quanto por meio de sementes. Estas, embora produzidas em grande quantidade, não possuem endosperma funcional, sendo incapazes de germinar na natureza, tornando-se necessária a associação simbiótica com fungos micorrízicos (13, 15, 17).

A hibridação entre gêneros e/ou espécies é freqüentemente baixa e, similarmente ao que ocorre com a propagação sexuada, uma baixa taxa de multiplicação é obtida com os métodos convencionais, como divisão de bulbos, brotações e *keikis* (estruturas de propagação), não atendendo às necessidades comerciais. Assim, a clonagem *in vivo* de orquídeas é um

processo muito lento, exigindo, às vezes, dez anos para se obter um novo clone (12).

A cultura de tecidos é uma metodologia que proporciona a produção de plantas uniformes e saudáveis, velocidade superior de crescimento, em relação aos métodos convencionais de propagação, maior produção em menor tempo e espaço físico e a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos (5).

Knudson (9) desenvolveu um método de cultura não-simbiótico, mostrando que as sementes podem germinar em meio de cultura contendo apenas sacarose. Posteriormente, ele aperfeiçoou esse meio, sendo, atualmente, o mais utilizado comercialmente na germinação e desenvolvimento de orquídeas (1). Entretanto, não há uma formulação-padrão para o meio Knudson que possibilite maior sucesso na micropropagação de todas as espécies ou variedades. Embora esse meio seja o mais comumente utilizado para a propagação de orquídeas, torna-se necessário determinar a concentração ótima de nutrientes para cada variedade.

A concentração de sacarose também é um fator determinante na promoção de crescimento e é dependente do tipo de explante (3). Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa deve-se à incorporação de carbono pela adição de sacarose (6). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura Knudson é de 20 g L⁻¹, entretanto, modificações nesse valor podem beneficiar o cultivo *in vitro*.

Por outro lado, o excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (19). Foi observado aumento na taxa de fotossíntese, em subculturas sucessivas, quando a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹ (10). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para produção comercial de mudas (8).

O maior entrave no processo de micropropagação de orquídeas está relacionado ao tempo necessário para a produção de mudas a partir de espécies híbridas selecionadas e à utilização de meio de cultura adequado para cada espécie. Assim, objetivou-se testar diferentes concentrações do meio de cultura Knudson e de sacarose no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* do cruzamento entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*, com aproximadamente 1,5 cm de

comprimento e desprovidas de raízes foram inoculadas em frascos de 250 ml de capacidade contendo 50 ml de meio de cultura.

Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações do meio de cultura Knudson (0, 50, 100, 150 e 200% da formulação original) e sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O meio foi acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e 32 μM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, com quatro repetições e 16 plântulas por repetição.

Após 90 dias, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea, número de raízes e peso da matéria fresca.

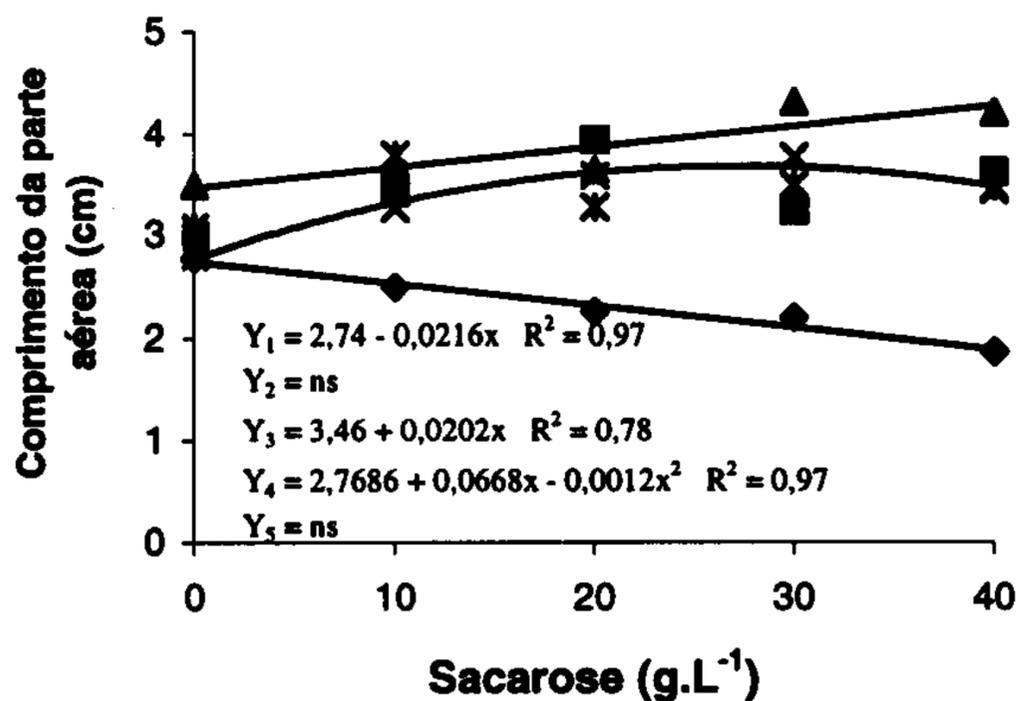
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comprimento da parte aérea aumentou até a concentração máxima de sacarose no meio de cultura Knudson em sua concentração original (100%), atingindo 4,2 cm (Figura 1). Porém, houve pequeno incremento nessa variável, com o aumento da concentração de 0 para 40 g L⁻¹ de sacarose. Essa resposta, provavelmente, foi devida ao fato de que o meio Knudson possui baixa concentração de sais, e embora seja muito utilizado na germinação de sementes de orquídeas, parece não propiciar condições satisfatórias para o desenvolvimento das plântulas. Mesmo que o comprimento da parte aérea tenha sido pouco incrementado com o aumento das concentrações de sacarose, pode-se notar sua influência no desenvolvimento das plântulas.

Esses resultados estão de acordo com outros, constatando que a utilização de 20 g L⁻¹ de sacarose proporcionou melhor desenvolvimento foliar de híbridos de *Phalaenopsis* (2). Maior incremento na taxa de crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Microtis parviflora* foi obtido com a suplementação de sacarose no meio de cultura (11).

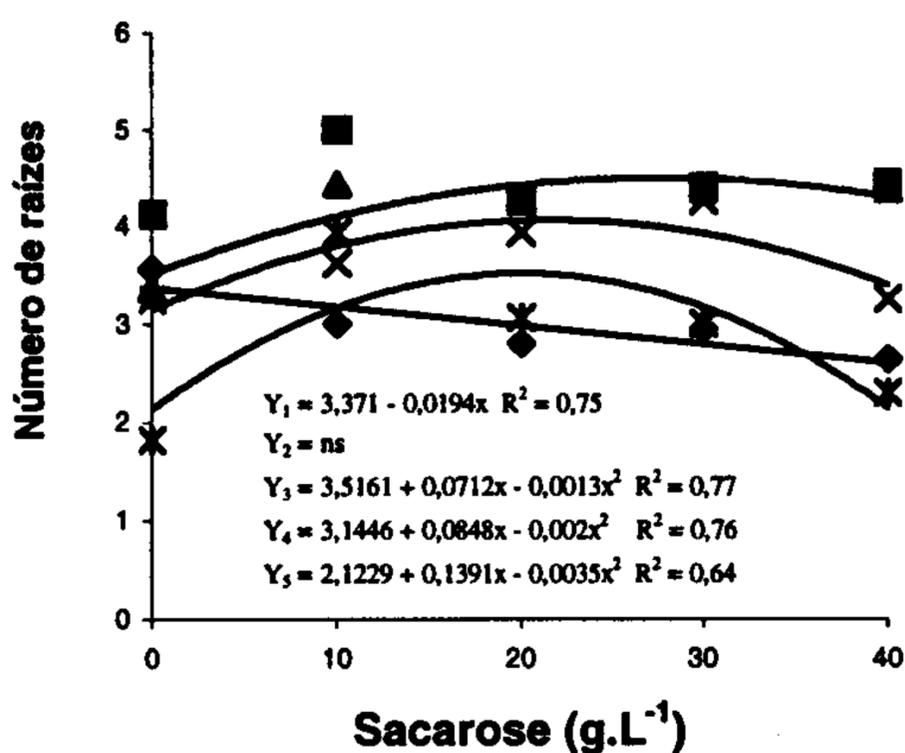
Maior número de raízes (4,5) foi obtido com 100% do meio de cultura Knudson, seguido de 150 (4,04) e 200% (3,5), associados a 27,38; 21,2; e 19,87 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente (Figura 2). Resultados similares foram obtidos quando se observou melhor crescimento do sistema radicular de plântulas de *Bletilla striata* utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (4). Os mesmos autores também verificaram que não houve desenvolvimento do sistema radicular na ausência de sacarose, evidenciando a essencialidade dessa fonte de carbono no meio de cultura para orquídeas.

Semelhantemente ao comprimento da parte aérea, os resultados evidenciam que a concentração de 100% é satisfatória para a formação e desenvolvimento de raízes.



◆ Y1 (0%) ■ Y2 (50%) ▲ Y3 (100%) ✕ Y4 (150%) ✖ Y5 (200%)

FIGURA 1 - Efeito da sacarose e concentrações do meio de cultura Knudson no comprimento da parte aérea de plântulas de orquídea do híbrido *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*.



◆ Y1 (0%) ■ Y2 (50%) ▲ Y3 (100%) ✕ Y4 (150%) ✖ Y5 (200%)

FIGURA 2 - Efeito da sacarose e concentrações do meio de cultura Knudson no número de raízes de plântulas de orquídea do híbrido *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*.

A utilização de 100% do meio de cultura proporcionou maior peso da matéria fresca de plântulas (0,41 g) com o aumento de sacarose até a concentração de 26,25 g L⁻¹ (Figura 3).

Quando se utilizaram 200% do meio de cultura houve incremento linear com o aumento da sacarose, proporcionando 0,40 g de peso de matéria fresca da plântula. Embora a alta concentração de sacarose tenha elevado o potencial osmótico, a absorção de nutrientes pelos explantes possivelmente não foi prejudicada, devido à alta concentração de sais no meio de cultura com 100% a mais da sua concentração original.

É importante notar o peso da matéria fresca da plântula obtido com o meio Knudson 0% (ausência de sais) e na ausência de sacarose, pois o bom resultado, em relação às demais variações, indica que este meio não supre as necessidades para o desenvolvimento de plântulas de orquídea.

Com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura Knudson 0% (ausência de sais) houve decréscimo no comprimento da parte aérea, número de raízes e peso da matéria fresca da plântula (Figuras 1, 2 e 3). É possível que o aumento da concentração osmótica do meio de cultura causado pelo incremento nas concentrações de sacarose tenha dificultado a absorção de água e nutrientes pelos explantes.

Em contrapartida, quando o meio foi utilizado em concentrações maiores, mesmo com o aumento das concentrações de sacarose houve incremento em todas as variáveis, indicando que o aumento na concentração de sais pode compensar o aumento do potencial osmótico do meio. A concentração de sacarose que proporcionou melhores resultados, de maneira geral, foi a normalmente utilizada no meio Knudson, 20 g L⁻¹.

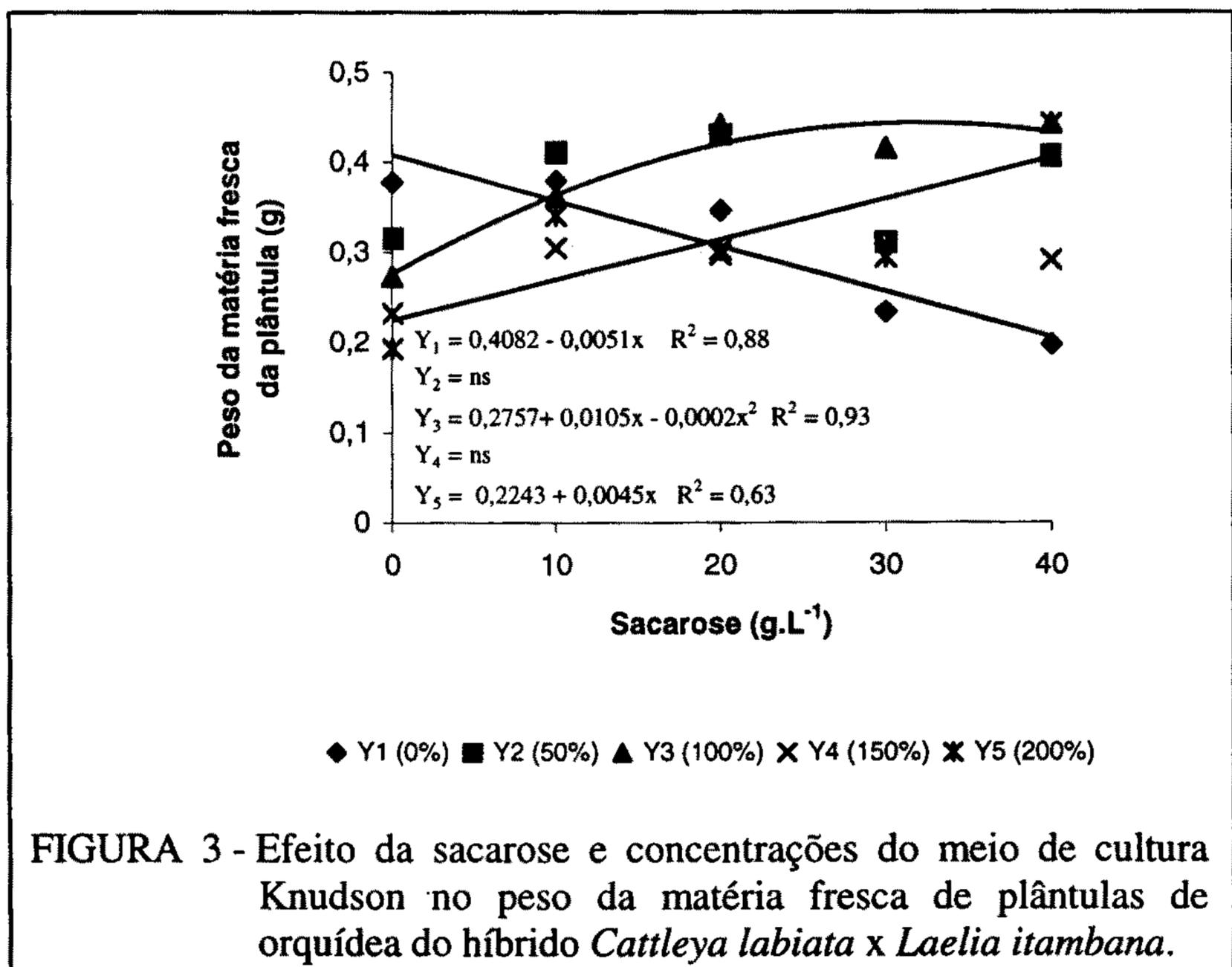


FIGURA 3 - Efeito da sacarose e concentrações do meio de cultura Knudson no peso da matéria fresca de plântulas de orquídea do híbrido *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*.

CONCLUSÃO

O meio de cultura Knudson em sua concentração original (100%) adicionado de 20 g L⁻¹ de sacarose proporciona crescimento satisfatório de plântulas de orquídea.

REFERÊNCIAS

1. ARDITTI, J. & ERNST, R. Micropropagation of orchids. New York, John Wiley & Sons, 1992. 682p.
2. BHATTARCHARJEE, S.; KHAN, H.A. & REDDY, P.V. Effect of various sucrose levels on in vitro seed germination of *Phalaenopsis* hybrid. Journal of Hill Research, 12: 58-60, 1999.
3. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.87-132.
4. CHO, K.H. & AHN, Y.H. Effect of sucrose and supplementary substances on the germination ecology and the seedling growth of native *Bletilla striata*. Korean Journal of Environment and Ecology, 14: 205-11, 2000.
5. CRÓCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: Simpósio Anual da Academia de Ciência de São Paulo, 11. Anais, São Paulo, 1986. p.53-71.
6. DE RIEK, J.; PIQUERAS, A. & DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 269-78, 1997.
7. GARAY, L.A. On the origin of the Orchidaceae. Botanical Museum of Harvard University, 19:57-96, 1960.
8. HOFFMANN, A. Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'. Lavras, UFLA, 1999. 240p. (Tese de doutorado).
9. KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette, 73: 1-25, 1922.
10. PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações, meios de cultura. Lavras, UFLA/FAEPE, 2001. 74p.
11. PERKINS, A.J.; MASUHARA, G. & MCGEE, P.A. Specificity of the associations between *Microtis parviflora* (Orchidaceae) and its mycorrhizal fungi. Australian Journal of Botany, 43: 85-91, 1995.
12. PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
13. SAVINA, G.I. Fertilization in orchids. In: Linskens, H.F. (ed.). Fertilization in higher plants. New York, American Elsevier, 1974. p.197-204.
14. SCHULTES, R.E. & PEASE, A.S. Generic names of orchids, their origin and meaning. New York, Academic Press, 1963. 331p.
15. SHEEHAN, T.J. Recent advances in botany propagation and physiology of orchids. Horticultural Reviews, 5: 279-315, 1983.
16. SILVA, W. O cultivo de orquídeas no Brasil. São Paulo, Nobel, 1986. 96p.
17. SINGH, F. Storage of orchid seeds in organic solvents. Garstenbauwissenschaft, 53: 122-4, 1988.

18. SINGH, F. Micropropagation of orchids *Spathogloottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. London, Springer-Verlag, 1992. V. 20, p.223-45.
19. YAMADA, Y. & SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiology*, 19: 691-9, 1978.
20. VAN DER PIJL, L. & DODSON, C.H. Orchid flowers: Their pollination and evolution. Coral Gables, University of Miami Press, 1966. 214p.