

ÁGUA DE COCO E POLPA DE BANANA NO CULTIVO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA

Aparecida Gomes de Araújo¹
Moacir Pasqual¹
Fabiola Villa¹
Fernanda Carvalho Costa¹

RESUMO

Objetivou-se testar diferentes concentrações de polpa de banana e de água de coco adicionadas ao meio Knudson C no desenvolvimento *in vitro* de orquídeas. Plântulas híbridas oriundas de sementes germinadas *in vitro* de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba', com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, foram inoculadas em frascos com capacidade de 250 cm³, contendo 50 mL de meio de cultura Knudson C suplementados com diferentes concentrações de água de coco (0, 50, 100, 150 e 200 mL L⁻¹) e polpa de banana 'Nanica' (0, 25, 50, 75 e 100 g L⁻¹), acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 6 g L⁻¹ de agar e pH ajustado para 5,8±0,1. Após 180 dias, verificou-se que a adição de 100 g L⁻¹ de polpa de banana promoveu maior alongamento da parte aérea e de raiz e maior acúmulo de massa fresca de raízes. A combinação de 50 e 200 mL L⁻¹ de água de coco e 100 g L⁻¹ de polpa de banana proporcionou melhores respostas para o número de raízes e massa fresca da parte aérea, respectivamente. A adição de 100 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura promoveu maior desenvolvimento de folhas nas plântulas cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: Orchidaceae, *Cattleya*, cultura de tecidos, substâncias inorgânicas.

ABSTRACT

COCONUT WATER AND BANANA PULP FOR *IN VITRO* GROWTH OF ORCHID PLANTLETS

The aim of this research was to test different concentrations of banana pulp and coconut water added to Knudson culture medium (KC), for *in vitro* orchid growth. *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' hybrid plantlets measuring 1.0 to 1.5 cm length were inoculated in 250 cm³ glass vessels containing 50 mL of Knudson C medium supplemented with different concentrations of coconut water (0, 50, 100, 150 and 200 mL L⁻¹) and 'Nanica' banana pulp (0, 25, 50, 75 and 100 g L⁻¹). The medium was solidified with 6 g L⁻¹ agar supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose and 2 g L⁻¹ of activated charcoal. The pH was adjusted to 5.8 ± 0.1. After 180 days, the addition of 100 g L⁻¹ of banana pulp promoted the greatest length of plantlets and also the largest length and fresh weight of roots. The combination of 50 and 200 mL L⁻¹ of coconut water with 100 g L⁻¹ of banana pulp led to the best responses for root number and fresh weight of aerial part, respectively. The addition of 100 mL L⁻¹ of coconut water in the absence of banana pulp promoted the best leaf development.

Keywords: Orchidaceae, *Cattleya*, tissue culture, organic substance.

¹ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Caixa Postal 3037. Lavras, MG. E-mail: agaraujo2003@yahoo.com.br; mpasqual@ufla.br

INTRODUÇÃO

A cultura assimbiótica ou semeadura *in vitro* de orquídeas constitui técnica bastante relevante dos pontos de vista comercial e ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (Araújo, 2004). A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, que é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes espécie-específicos (Araújo, 2004). A obtenção de orquídeas a partir da semeadura *in vitro* é, atualmente, um processo rotineiro. No entanto, os conhecimentos sobre a melhor formulação do meio de cultura para cada espécie ainda são limitados. Um grande número de fatores complexos influencia a germinação e o crescimento *in vitro* de orquídeas, sendo altamente dependentes da espécie (Silva *et al.*, 2002).

Atualmente, orquidófilos estão produzindo suas próprias mudas, em laboratórios caseiros, por germinação assimbiótica *in vitro*, utilizando meios de cultura de constituição orgânica (Silva *et al.*, 2002). Entre os extratos naturais utilizados na cultura de sementes de orquídea, estão a polpa de banana homogeneizada, água de coco, peptona, triptona, levedura de cerveja, caseína hidrolisada, suco de tomate, suco de abacaxi e extrato de batata (Torres *et al.*, 2001). Essas misturas aumentam os efeitos das vitaminas e dos aminoácidos e alguns agem como reguladores de crescimento (Pierik, 1989).

Vários elementos aditivos complexos como coco (endosperma, água, leite), peptona de carne e polpa de banana (verde ou madura) foram utilizados nos meios de cultura de tecidos ou de germinação de orquídeas (George, 1993). Há relatos da utilização da polpa de banana na germinação de *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* (Arditti & Ernst, 1993). Entretanto, os dados comparativos disponíveis não permitem uma discussão razoável sobre o efetivo estímulo ao crescimento promovido por esses elementos (George, 1993).

A água de coco, em geral de 3 a 15% (v/v), é o aditivo que mais tem sido utilizado para um grande número de espécies *in vitro*, não somente para estimular o crescimento de calos, mas também para aumentar a

formação de embriões somáticos, induzir a divisão de grãos de pólen e, na sua primeira aplicação, na indução do desenvolvimento de embriões imaturos (Caldas *et al.*, 1998). A água de coco contém sais minerais, mio-inositol e citocinina(s), bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Caldas *et al.*, 1998).

Silva *et al.* (2005), estudando a micropropagação de orquídea *Brassolaeliocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow', observaram que a adição de 75 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica' madura ao meio Knudson C (1946) promoveu a formação de maior número de brotos. Concentrações crescentes de polpa de banana ao meio corresponderam a incrementos no comprimento médio do sistema radicular e da massa fresca total de plântulas.

O uso da polpa de banana em cultura *in vitro* de orquídeas é citado por muitos autores, como Ernst, que propôs a adição no cultivo de *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis* (Arditti & Ernst, 1993). Com a água de coco, a polpa de banana verde foi adicionada ao meio Vacin & Went (1949) na propagação *in vitro* de *Aranda wendy* Scott e *Aranthera james* Storei. Para o crescimento das gemas e multiplicação dos protocolos, foi usada apenas água de coco (15%, v/v) e na indução de brotos de *Aranda wendy* Scott, foi utilizada a polpa de banana (5%, p/v); para induzir o enraizamento, ambos suplementos foram adicionados (Chead & Sagawa, 1978). Alguns autores sugerem o meio Vacin & Went para *Cattleya*, *Encyclia* e *Oncidium*, suplementado com 25% (v/v) de água de coco e o meio Knudson C suplementado com 60 g L⁻¹ de polpa de banana para orquídeas do gênero *Stanhopea* (Villalobos *et al.*, 1994).

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar as concentrações de água de coco e polpa de banana, que, acrescidas ao meio Knudson C, proporcionaram melhor crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba'.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas da espécie *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba', oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes, foram inoculadas em meio Knudson C (Knudson, 1946) adicionado de diferentes concentrações de água de coco verde (0, 50, 100, 150 e 200 mL L⁻¹)

e polpa de banana 'Nanica' madura (0,25,50,75 e 100 g L⁻¹). O meio foi acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, 6 g L⁻¹ de ágar brasileiro e pH ajustado para 5,8 ± 0,1.

Foram vertidos em frascos de vidro 50mL de meio de cultura, com capacidade para 250 cm³, vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 mmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5, com quatro repetições (frasco) contendo cinco plântulas por frasco.

Decorridos 180 dias da instalação, analisaram-se o número de folhas, o número de raízes, o comprimento da maior raiz, o comprimento da parte aérea, a massa fresca de raízes e a massa fresca da parte aérea.

Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial, empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao número de folhas, apenas as concentrações de 50, 100 e 150 mL L⁻¹ de água de coco combinadas com todas as concentrações de polpa de banana 'Nanica' tiveram significância estatística. Maior número de folhas (8,36/plântula) foi observado quando foram adicionados 100 mL L⁻¹ de água de coco ao meio Knudson C na ausência da polpa de banana. As concentrações de 50 e 150 mL L⁻¹ tiveram resultados inferiores (7,5 e 7,66, respectivamente) também na ausência da polpa de banana. Concentrações crescentes de polpa de banana promoveram redução linear na quantidade de folhas emitidas pelo explante (Figura 1). A adição simultânea da polpa de banana e da água de coco pode ter desequilibrado os nutrientes do meio, prejudicando a emissão de folhas.

As concentrações de polpa de banana e de água de côco apresentaram interação significativa para o número de raízes. Porém, em relação à polpa de banana, somente as concentrações de 50 e 200 mL L⁻¹ de água de coco foram significativas (Figura 2).

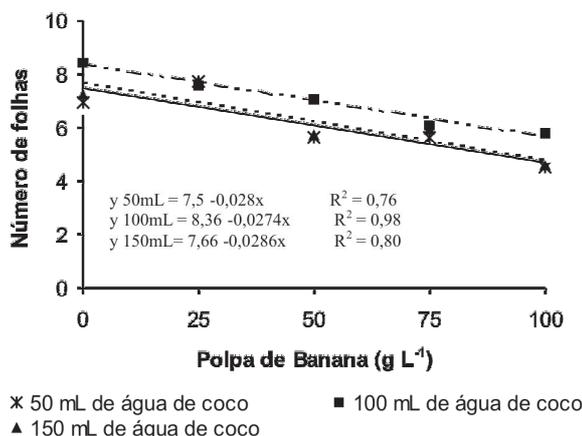


Figura 1. Número médio de folhas em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de polpa de banana e água de coco.

O maior número de raízes (6,5) foi verificado com a utilização do meio de cultura KC, acrescido de 50 ou 200 mL L⁻¹ de água de coco, combinado com 100 g L⁻¹ de polpa de banana, enquanto que, na ausência de polpa de banana, foram obtido valores inferiores (Figura 2).

O aumento das concentrações de polpa de banana influenciou positivamente a formação de raízes (6,5) quando foram utilizados 100 g L⁻¹ de polpa de banana combinados com 200 mL L⁻¹ de água de coco. Porém, com a utilização de 75 g L⁻¹ de polpa de banana e 200 mL L⁻¹ de água de coco, o número de raízes formadas foi de 6,4. Essa diferença (0,1) é muito pequena, não justificando a utilização de um meio com maior quantidade de polpa de banana.

Analisando o enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl em diferentes meios de cultura Song *et al.* (1999) verificaram que a formulação

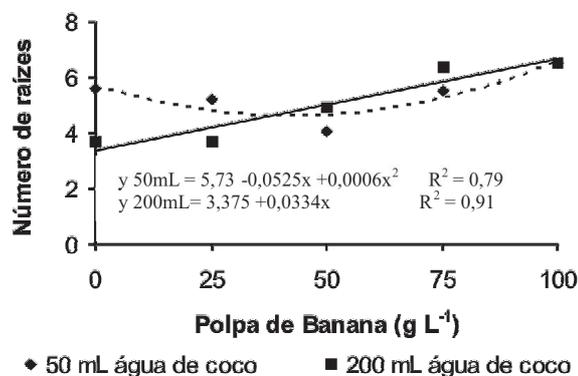


Figura 2. Número médio de raízes em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de polpa de banana e água de côco.

Adubo Peters® - 3 g L⁻¹ + 20 g L⁻¹ de sacarose + 60 g L⁻¹ de polpa de banana proporcionou maior número de raízes. A concentração de polpa de banana utilizada por Song *et al.* (1999) foi próxima à utilizada neste trabalho.

Para o comprimento da maior raiz, efeitos significativos foram observados apenas para os níveis de polpa de banana. Verificaram-se melhores respostas de alongamento (3,9 cm) com a adição de 100 g L⁻¹ de polpa de banana ao meio Knudson (Figura 3).

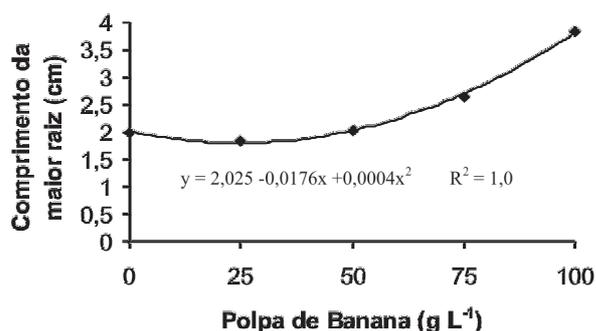


Figura 3. Comprimento médio da maior raiz em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de polpa de banana.

Segundo Torres & Barbosa (2001), a polpa de banana pode promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, como espessamento e/ou crescimento de raízes, dependendo da cultivar e da quantidade de polpa utilizada.

Para o parâmetro comprimento da parte aérea, efeitos significativos foram observados apenas para os níveis de polpa de banana. Observou-se maior crescimento da parte aérea (5,12 cm) em meio Knudson C suplementado com 100 g L⁻¹ de polpa de banana (Figura 4).

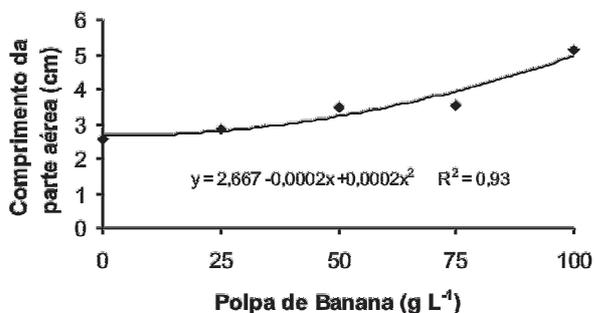


Figura 4. Comprimento médio da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de polpa de banana.

Em contraste, Simões *et al.* (1999), estudando o efeito de diferentes meios de cultura, água de coco e carvão ativado na propagação *in vitro* de meristemas de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp., observaram maior crescimento quando foram acrescentados 100 mL L⁻¹ de água de coco ao meio Knudson C. Estudando o crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl, em diferentes meios de cultura, Song *et al.* (1999) concluíram que a formulação Adubo Peters® - 3 g L⁻¹ + 20 g L⁻¹ de sacarose + 60 g L⁻¹ de polpa de banana foi mais eficiente para o crescimento de altura das plântulas.

Efeitos significativos da massa fresca de raízes foram observados apenas para o fator concentração de polpa de banana (Figura 5).

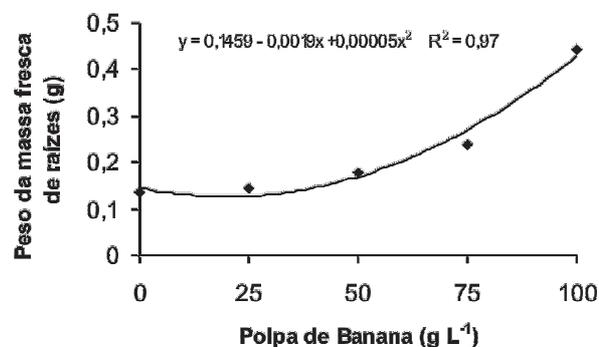


Figura 5. Massa fresca média de raízes de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de concentrações polpa de banana.

À medida que se adicionou a polpa de banana ao meio KC, aumentou-se a quantidade de raízes formadas e, conseqüentemente, a massa fresca de raízes.

A interação entre os níveis de polpa de banana e água de coco foi significativa para a massa fresca da parte aérea. Os melhores resultados para este parâmetro foram observados com a utilização de 200 mL L⁻¹ de água de coco combinados com 100 g L⁻¹ de polpa de banana. O incremento das concentrações de polpa de banana promoveu aumento na massa fresca da parte aérea (Figura 6).

As concentrações de polpa de banana incorporadas ao meio Knudson influenciaram o desenvolvimento de maneira significativa. Como a relação foi direta, pode-se inferir que o efeito benéfico da polpa de banana no tamanho da maior raiz e da parte aérea e na massa fresca de raízes e da parte aérea continuaria para concentrações superiores a 100 g L⁻¹ de polpa de banana. Entretanto, esses resultados precisam ser confirmados.

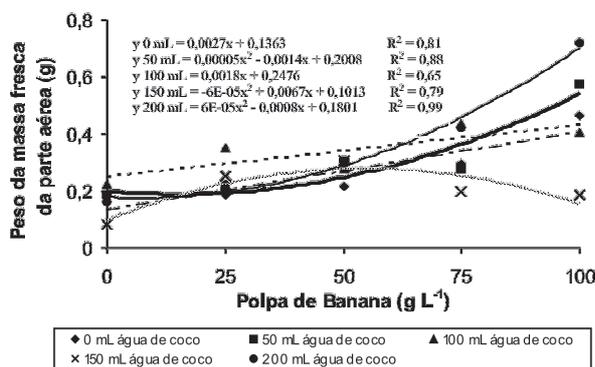


Figura 6. Massa fresca média da parte aérea de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas em meio KC acrescido de água de coco e polpa de banana.

Estudando o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina*, Silva *et al.* (2002) testaram diferentes meios de cultura, incluindo um meio orgânico constituído de 14 g L⁻¹ de sacarose, 5 g L⁻¹ de carvão ativado, 150 mL L⁻¹ de água de coco, 5 tomates cerejas, 40 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica' e 9 g L⁻¹ de ágar e, observaram que esse meio apresentou valores superiores para massa fresca de plântulas, em relação ao meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e ao meio Vacin & Went (1946), aos 120 dias de cultivo. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas.

Esse efeito provavelmente é devido à composição da polpa de banana, rica em aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento (George, 1993). A adição de polpa de banana aumenta o número de brotos no cultivo de plântulas de orquídeas *in vitro* (Silva *et al.*, 2005 e

REFERÊNCIAS

- Araújo AG (2004) Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea. 2004. Dissertação de mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 73 p.
- Arditti J & Ernst R (1993) Micropropagation of orchids. New York: John Wiley & Son, 682 p.
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPq, v. 1. p. 87-132.
- Chad KT & Sagawa Y (1978) *In vitro* propagation of *Aranda wendy* Scott and *Aranthera james* Storei. HortiScience 13: 661-662.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos. Anais... UFSCar. p. 255-258.

Arditti & Ernst, 1993), além de promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea e emissão de brotos adventícios (Torres & Barbosa, 2001). Além disso, a polpa de banana pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ao meio de cultura, promovendo o aumento do peso da matéria fresca da plântula (Silva *et al.*, 2005, e George, 1993).

De modo geral, a capacidade tamponante dos meios nutritivos é baixa. O acréscimo de água de coco, por sua vez, aumenta essa capacidade tamponante (Caldas *et al.*, 1998), sendo, provavelmente, uma das causas da maior produção de massa fresca da parte aérea e maior número de folhas. Outro importante fator para explicar os resultados seria a presença de aminoácidos e citocininas na água de coco (Silva *et al.*, 2002).

CONCLUSÃO

A adição de 100 g L⁻¹ de polpa de banana promove o crescimento da parte aérea e da raiz e o aumento da massa fresca de raízes de plântulas de orquídea da espécie *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba'. Quando combinada com 50 e 200 mL L⁻¹ de água de coco, proporciona melhores respostas para o número de raízes e massa fresca da parte aérea, respectivamente. A adição de 100 mL L⁻¹ de água de coco, na ausência de polpa de banana, promoveu maior desenvolvimento de folhas, no cultivo *in vitro*.

- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology. 2. ed. Exegetics Ltd., England. 786 p.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 14:214- 217.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Pierik RLM (1989) *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff, 2nd ed. 344 p.
- Silva ALL da, Franco ETH, Gesing JPA. & Pessoa CC (2002) Efeitos de alguns meios de cultura sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer - Orchidaceae. ABCTP Notícias 4-7.
- Silva EF, Pasqual M, Paiva PDO, Silva AB & Nogueira DA (2005) Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. Plant Cell Culture & Micropropagation 1: 8-12.

- Simões FC, Paiva PDO & Rodrigues TM (1999) Efeito de diferentes meios de cultura, água de côco e carvão ativado na propagação *in vitro* de meristemas de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp. In 12^a Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Jaboticabal. Anais... p.109.
- Song MKR, Silva GL, Faria RT & Takahashi LSA (1999) Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In 12^a Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Jaboticabal. Anais... p.110.
- Torres AC, Barbosa NV, Willadino L, Guerra MP, Ferreira CF & Paiva SAV (2001) Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças (Circular Técnica). 20p.
- Torres AC & Barbosa NVR (2001) Condições de incubação para cultura *in vitro*. ABCTP Notícias 1-7.
- Vacin E & Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solution. Botanical Gazette 110: 605-613.
- Villalobos AL, Muñoz JM & Sosa-Moss C (1994) Cultivo de tejidos de orquídeas: *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Stanhopea*. Revista Chapingo, 1: 58-62.