

Comunicação

Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes

Joyce Dória Rodrigues Soares¹
Filipe Almendagna Rodrigues¹
Aparecida Gomes de Araujo²
Moacir Pasqual³
Franscinely Aparecida de Assis¹

RESUMO

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecidos é um valioso instrumento na propagação rápida de mudas de orquídeas, uma vez que o processo convencional não atende às necessidades de mercado. Foram realizados dois experimentos com duas espécies de orquídea: *Cattleya loddigesii* e *C. percivaliana*, com o objetivo de avaliar a influência exercida pela quantidade de meio de cultura Knudson C e pelo número de explantes por frasco de cultura, sobre o crescimento de ambas *in vitro*. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, foram inoculadas em frascos contendo 25, 50, 75 ou 100 mL de meio e 3, 6, 9 ou 12 explantes por frasco. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25 \pm 1°C e fotoperíodo de 16 horas. Ao final de 90 dias foram avaliados número de folhas, número de brotos, número de raízes, comprimento de parte aérea e massa seca de plântulas. Melhores resultados para o crescimento *in vitro* de *C. percivaliana* e de *C. loddigesii* podem ser obtidos com a utilização de 12 explantes e com 25 e 75 mL de meio de cultura Knudson C, respectivamente.

Palavras chave: Orchidaceae, *Cattleya loddigesii*, *C. percivaliana*, cultura *in vitro*.

ABSTRACT

In vitro orchid growth: amount of culture medium and number of explants per flask

Vegetative propagation by tissue culture provides a valuable tool for rapid clonal propagation of orchid seedlings, since the conventional method does not meet market demand. Two experiments using the two orchid species *Cattleya loddigesii* and *C. percivaliana* were carried out to test different volumes of Knudson C culture medium and evaluate the ideal number of orchid explants for *in vitro* multiplication. Seedlings obtained from *in vitro* germinated seeds, measuring approximately 1.0 cm in length, were transferred into flasks with 25, 50, 75 or 100 mL of medium and 3, 6, 9 or 12 plantlets per flask. The cultures were maintained in culture rooms under a 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ irradiance, temperature at 25 \pm 1°C and 16 h photoperiod. After 90 days, the following traits were evaluated: number of leaves, shoots and, roots, length of aerial part and dry mass of plantlets. For best results of *in vitro* growth *Cattleya percivaliana* and *C. loddigesii*, it is recommended 12 explants/flask and 25 and 75 mL of culture medium per flask, respectively.

Key words: Orchidaceae, *Cattleya loddigesii*, *C. percivaliana*, *in vitro* culture.

¹ Mestrando (a) em Agronomia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. E-mail: joycerodrigues01@ yahoo.com. br; filipealmendagna@yahoo.com.br

² Pós-Doutoranda em Agronomia/ Fitotecnia - UFLA. E-mail: agaraujo2003@yahoo.com.br

³ Professor Titular do Departamento de Agricultura - UFLA. E-mail: mpasqual@ufla.br

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae apresenta-se com aproximadamente 35.000 espécies e vários híbridos, sendo considerada a mais evoluída e a maior família do reino vegetal (Suttleworth *et al.*, 1994). A flor do gênero *Cattleya*, denominada “rainha” dentro desse reino, engloba cerca de 70 espécies e inúmeras variedades e híbridos (Silva, 1986). Constitui um dos mais belos ornamentos das matas tropicais e subtropicais da América, tornando-se o mais popular e o mais cultivado gênero da família das orquídeas (Raposo, 1993).

Cattleya loddigesii Lindley encontra-se distribuída por diversas regiões tropicais das Américas do Sul e Central. Possui de 3 a 6 flores, entre 8 a 11 cm de envergadura e com espata na base. São plantas epífitas (raízes aéreas) de regiões elevadas e de matas com elevado grau de umidade (Miller & Warren, 1996).

Cattleya percivaliana é nativa dos Andes Venezuelanos nos estados de Lara, Trujillo, Tachira e Mérida. De hábito rupícola, possui de 2-5 flores com um diâmetro de 10-18 cm. Esta espécie prefere locais com maior intensidade luminosa (ou mais ensolarados) e menor quantidade de água do que outras espécies do gênero *Cattleya* (Info jardim, 2008).

A micropropagação permite que uma planta de interesses desejáveis possa ser multiplicada por vários subcultivos, havendo a possibilidade de que uma nova cultivar esteja disponível mais rapidamente para uso comercial (Pasqual, 2000). A propagação *in vitro* vem sendo utilizada em inúmeras espécies vegetais, pela alta qualidade fitossanitária das plantas produzidas, em curto espaço de tempo, independente da época do ano e pela possibilidade de manutenção da identidade genética dos indivíduos (Guerra *et al.*, 1999; Kozay *et al.*, 1997).

Para o sucesso de um projeto biotecnológico deve-se levar em conta qual ou quais os produtos a serem desenvolvidos, escolhidos em função da demanda e dos seus preços finais, buscando-se sempre uma baixa relação custo/benefício. A demanda crescente por plantas e flores de orquídeas tem obrigado os produtores a comprar mudas de laboratórios especializados, os quais tendem a diminuir seus custos de produção. O investimento em material, infra-estrutura e mão de obra treinada, obriga esses laboratórios a minimizar perdas e maximizar a utilização dos fatores envolvidos na produção (Stancato, 2001).

Para multiplicação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*) foi observado que os explantes colocados em 30 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescidos de 3,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 1,0 mg L⁻¹ de AIA (ácido indol acético) apresentaram dife-

renças significativas apenas para o fator número de explantes/frasco (Timbó & Carvalho, 2003). As taxas de multiplicação obtidas nos frascos contendo 4 explantes (6,21) e 5 explantes (6,22) foram superiores aos tratamentos com 6 explantes (4,59). Ainda segundo tal estudo, para as cultivares de gérbera testados, não foram observadas diferenças significativas, obtendo-se as taxas de multiplicação de 5,73 para a cultivar Telly e 5,61 para a cultivar Igor.

Ao se estudar o efeito de diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de meio MS + 1,5 mg L⁻¹ de BAP, na multiplicação de *Psychotria ipecacuanha* (ipeca) em condições *in vitro*, foi observado que os volumes de 30 e 40 mL foram significativamente melhores (com aproximadamente 7 e 8 brotos/frasco, respectivamente) na indução de brotações nesta espécie, quando comparados com os volumes de 10 e 20 mL (Reis *et al.*, 2003).

Um fator relevante na redução de custos para produção de mudas *in vitro* é a utilização do volume adequado de meio de cultivo e bem como ótimo número de plântulas por frasco que, conseqüentemente, irão favorecer a diminuição dos custos finais.

Neste contexto, objetivou-se determinar a melhor quantidade de meio de cultivo Knudson C e o número ideal de plântulas por frasco, que proporcionem melhor crescimento *in vitro* para as plântulas de *C. loddigesii* e *C. percivaliana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *C. loddigesii* e *C. percivaliana*, obtidas através de germinação de sementes, oriundas de autofecundação, foram submetidas à uniformização em meio Knudson C (Knudson, 1946) durante três meses. Após este período, em cada frasco com capacidade de 250 mL, contendo 25, 50, 75 ou 100 mL do mesmo meio Knudson C, foram inoculadas 3, 6, 9 ou 12 plântulas com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. O meio teve seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e foi solidificado com 5% de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C, 1 atm durante 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas diárias, com intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4, com quatro repetições de um frasco cada. Decorridos 90 dias da instalação, avaliou-se o número de folhas, número de brotos, número de raízes, comprimento de parte aérea e massa seca das plântulas. Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de folhas

Para *C. percivaliana* não houve significância dos fatores estudados em relação ao número de folhas formadas, enquanto para *C. loddigesii* encontrou-se significância da interação (número de plântulas e quantidade de meio nutritivo). Melhores resultados para esta variável (9,5 folhas) foram observados com a utilização de 75 mL de meio de cultura Knudson C e 3 plântulas/frasco (Figura 1), embora a quantidade ótima de meio de cultura esteja em 82,7 mL apresentando 9,6 folhas, segundo a curva de regressão.

Número de raízes

Nas culturas de *C. loddigesii* observou-se uma interação significativa para número de raízes. Melhores respostas (6,30) foram verificadas com a utilização de 75 mL de meio nutritivo (com ótimo em 77,8 mL, registrando-se 6,31 raízes) e 3 plântulas por frasco (Figura 2). Resultados semelhantes foram observados em mudas micropropagadas de bananeira cv. Maçã, com maior enraizamento de plântulas com a utilização de 5 explantes por frasco e 30 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) + 0,01 mg L⁻¹ de ANA (Costa & Carvalho, 2003).

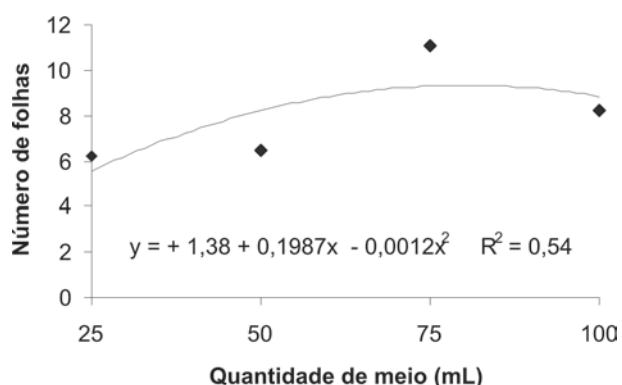


Figura 1. Número de folhas nas culturas de *Cattleya loddigesii* iniciadas com três plântulas/frasco em relação às diferentes quantidades de meio Knudson C.

A cultura de *C. percivaliana* apresentou valores estatisticamente significativos para os fatores isoladamente. Melhores resultados para número de raízes foram obtidos com a utilização de 12 plântulas por frasco, não diferindo do tratamento onde se utilizou 9 plântulas (Figura 3). Porém, para um aproveitamento ótimo do meio de cultura recomenda-se a inoculação de 12 plântulas por frasco, uma vez que os resultados obtidos foram equivalentes. Nesta espécie de *Cattleya*, o melhor resultado, para o fator quantidade de meio, foi obtido com a utilização de 25 mL de meio de cultivo (Figura 4).

Número de brotos

Para a variável número de brotos na cultura de *C. loddigesii* não foram verificadas diferenças estatísticas entre os fatores analisados isoladamente, nem quanto à interação entre eles. Analisando-se a Figura 5 verifica-se que as culturas de *C. percivaliana* apresentaram significância apenas para o fator quantidade de meio, obtendo-se maior número de brotos formados (1,53) com a utilização de 25 mL de meio em cada frasco. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores trabalhando com *Aechmea chantinii* e *Gerbera jamesonii* (Sato-Dias *et al.*, 2003; Timbó & Carvalho, 2003).

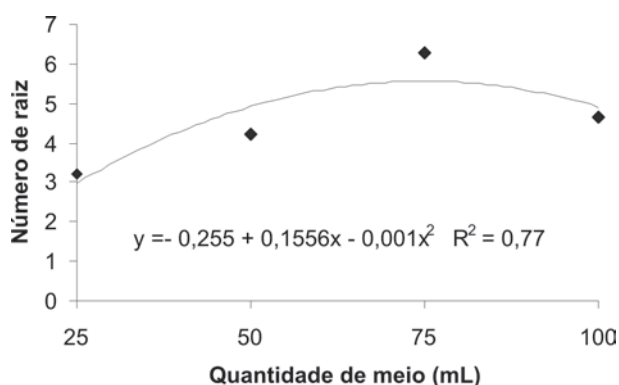


Figura 2. Número de raízes nas culturas de *Cattleya loddigesii* iniciadas com três plântulas/frasco em relação às diferentes quantidades de meio Knudson C.

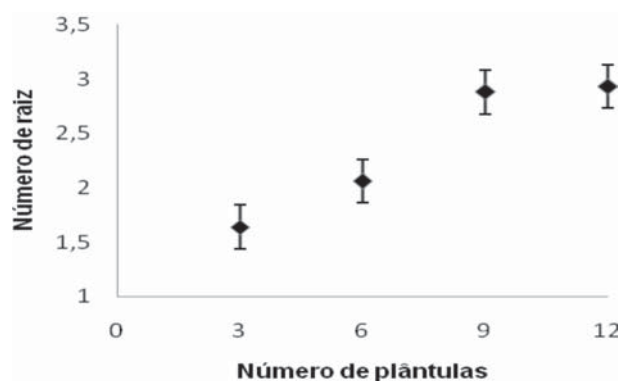


Figura 3. Número de raiz nas plântulas de *Cattleya percivaliana*, independente da quantidade de meio de cultura utilizado.

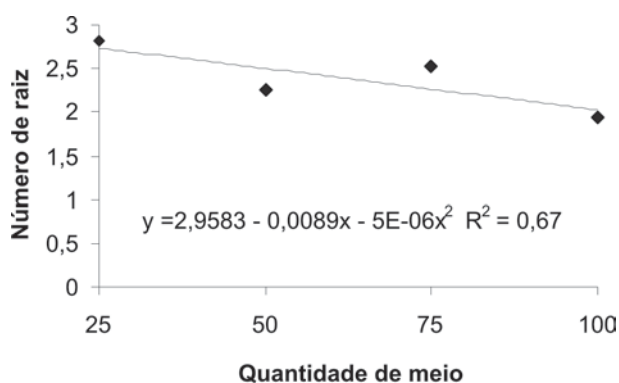


Figura 4. Número de raízes nas culturas de *Cattleya percivaliana* iniciadas com três plântulas/frasco em relação às diferentes quantidades de meio Knudson C.

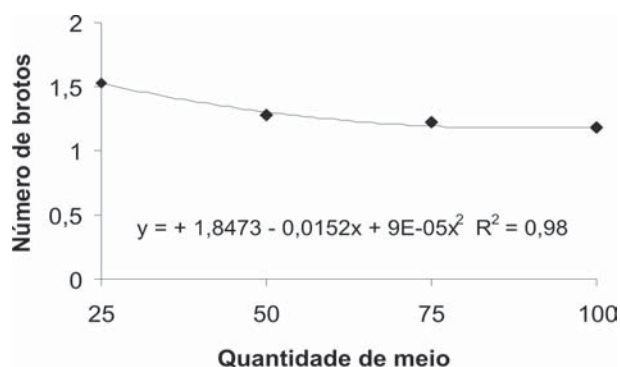


Figura 5. Número de brotos nas culturas de *Cattleya loddigesii* iniciadas com três plântulas/frasco em relação às diferentes quantidades de meio Knudson C.

O fator número de explantes por frasco na cultura de *C. percivaliana* não apresentou diferença significativa. No entanto, Braga *et al.* (2003), estudando o efeito do número de explantes/frasco, em abacaxi ornamental (*Ananas bracteatus*), encontrou resultados significativos, registraram maiores taxas de multiplicação *in vitro* em meio de cultura com quatro explante por frasco apresentando 4,55 brotos.

Comprimento da parte aérea

Na análise do comprimento de parte aérea das plântulas de *C. loddigesii* não foram observadas interações significativas, nem significância dos fatores isolados. Entretanto, nas culturas de *C. percivaliana* verificou-se significância apenas para o fator número de explante por frasco registrando-se maior comprimento de parte aérea das plântulas com a utilização de 3 explantes por frasco (1,8 cm). Embora o tratamento com 12 explantes por frasco (1,66 cm) tenha diferido estatisticamente do tratamento com 3 explantes por frasco (Figura 6), essa diferença pode ser considerada pequena em níveis práticos, o que justifica utilizar maior quantidade de explantes/frasco para economizar nos custos. A utilização de 4 plântulas/frasco não causou efeito negativo quando comparado com 5 e 6 plântulas/frasco no desenvolvimento das bromélias *Aechmea chantinii* e abacaxi ornamental (Sato-Dias *et al.*,

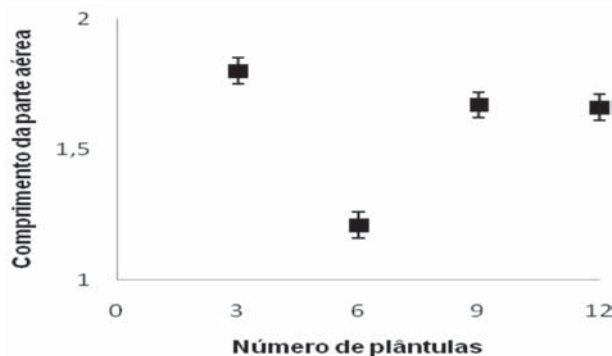


Figura 6. Comprimento da parte aérea das plântulas de *Cattleya percivaliana* em relação ao número de explantes por cultura.

2003; Braga *et al.*, 2003). Provavelmente, a orquídea tenha menor competição, entre si, por nutrientes contidos no meio de cultura em relação às bromélias. Fato esse constatado com melhores resultados encontrados com a utilização de 12 em relação a 4 explantes para orquídeas e bromélias, respectivamente.

Massa seca de plântulas

A variável massa seca de plântulas de *Cattleya loddigesii* não apresentou efeito significativo para os fatores estudados e nem para a interação dos mesmos. A interação dos fatores (número de explante x quantidade de meio) pode ser verificada nas culturas de *C. percivaliana* que apresentaram maior massa seca de plântulas com a utilização de 75 mL de meio Knudson C e 3 plântulas/frasco (Figura 7).

Nas culturas de banana cv Maçã (Costa & Carvalho, 2003), foram obtidos melhores resultados em relação à massa seca das plântulas com a utilização de 4 ou 6 explantes por frasco, embora utilizando 12 horas de fotoperíodo. Isto significa em uma redução dos custos de produção dessa muda micropropagada (Costa & Carvalho, 2003).

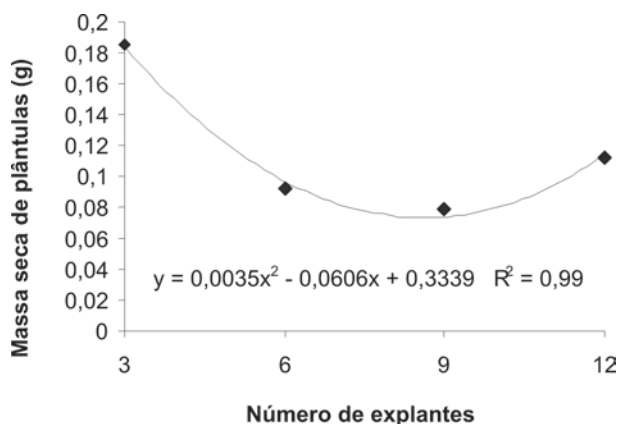


Figura 7. Massa seca das plântulas de *Cattleya percivaliana* nas culturas contendo 75 mL de meio de cultura Knudson C e diferentes números de explantes.

CONCLUSÃO

Melhores resultados para o crescimento *in vitro* de *C. percivaliana* e de *C. loddigesii* podem ser obtidos com a utilização de 12 explantes e com 25 e 75 mL de meio de cultura Knudson C, respectivamente.

REFERÊNCIAS

Braga EP, Morais JPS, Carvalho ACPP, Santos MRA (2003) Avaliação dos efeitos do número de explantes, do meio de cultura e do fotoperíodo na multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas bracteatus*). In: 14º. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras-MG. p. 312.

- Costa AMG, Carvalho ACPP (2003) Avaliação dos efeitos do número de explantes por frasco e do fotoperíodo na taxa de micropropagação de bananeira cv. Maçã. In: 14º. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras-MG. p. 143.
- 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, São Carlos: UFSCAR. p. 225-258.
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34:1557-1563.
- Info Jardim 2008 Disponível em: <<http://www.orquideas.itgo.com/castellano/cattleyas.htm>> Acesso em: 17 de janeiro de 2008.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 14: 214- 217.
- Kozay T, Kubota C, Jeong BR (1997) Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51:49-56.
- Miller D, Warren R (1996) Orquídeas do Alto da Serra. Rio de Janeiro. Salamandra Ltda, 1:200-228.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.
- Pasqual M (2000) Propagação de plantas ornamentais. Lavras, UFLA/FAEPE. 80p.
- Raposo JGCMF (1993) A etimologia a serviço dos orquidófilos. São Paulo, Ave Maria Ltda. 308p.
- Reis ES, Pinto JEB, Corrêa RM, Pereira FD, Bertolucci SKV (2003) Avaliação de diferentes volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha*) *in vitro*. In: 14º. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras-MG. p. 272.
- Sato-Dias AY, Paula CC, Motoike SY, Dias JMM, Figueiredo ML, Carvalho VS (2003) Propagação *in vitro* de *Aechmea chantinii*: Efeito do número de plântulas. In: 14º. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras-MG. p. 146.
- Silva W (1986) Cultivo de orquídeas no Brasil. São Paulo, Nobel, 96 p.
- Stancato GC, Bemelmans PF, Vegro CLR (2001) Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental. Campinas, 7:25-33.
- Suttleworth FS, Zim HS, Dillon GW 1994 Orquídeas: Guia dos orquidófilos. Tradução: Joaquim Gonzáles de Lema Filho, 5 ed. Rio de Janeiro, Expressão e cultura, 158p.
- Timbó ALA, Carvalho ACPP (2003) Avaliação dos efeitos da cultivar, do número de explantes e do meio de cultura na multiplicação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*). In: 14º. Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras-MG. p. 356.