

## Efeito do boro ( $H_3BO_3$ ) e manganês ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) na micropropagação de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae)

Milene Alves de Figueiredo Carvalho<sup>1</sup>, Moacir Pasqual<sup>2</sup>, Flávia Carvalho Santos<sup>2</sup>, Vantuil Antônio Rodrigues<sup>2</sup>, Juliana Costa de Rezende<sup>2</sup>, Janice Guedes de Carvalho<sup>3</sup>

### RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar o efeito de diferentes concentrações de Boro ( $H_3BO_3$ ) e Manganês ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) do meio Knudson C (KC) no cultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*. Boro e Manganês são compostos essenciais requeridos para a atividade de diversas enzimas envolvidas na respiração e/ou fotossíntese. Sementes de *C. loddigesii* foram germinadas *in vitro*. Após um mês, brotos com 1 a 1,5 cm de comprimento, contendo raízes pequenas ( $\pm 0,5$  cm), foram excisados e inoculados em frascos com capacidade de 250 cm<sup>3</sup> e contendo 60 mL do meio KC suplementado com  $H_3BO_3$  (0; 0,056; 1,4; 2,8; e 5,6 mg L<sup>-1</sup>) e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (0; 3,75; 7,5; 15; e 30 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis, acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana (cultivar “nanica”). Após 90 dias, melhor crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea foi obtido em meio KC contendo concentrações 1,4 mg L<sup>-1</sup> de  $H_3BO_3$  e 15 mg L<sup>-1</sup>  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ .

**Palavras-chave:** Planta ornamental, meio de cultura, crescimento *in vitro*, boro, manganês.

### ABSTRACT

#### The effect of boron and manganese on *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae) micropropagation

The current work aimed at studying the effect of different concentrations of Boron ( $H_3BO_3$ ) and Manganese ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) in the Knudson C (KC) medium on the *in vitro* culture of *Cattleya loddigesii* seedlings. Both Boron and Manganese are essential compounds required for the activity of several enzymes involved in respiration and/or photosynthesis. Seeds of *C. loddigesii* were *in vitro* germinated. After one month, shoots (1 to 1.5 cm in length) containing small roots ( $\pm 0.5$  cm) were excised and inoculated in 250 cm<sup>3</sup> flasks containing 60 mL of the (KC) medium supplemented with  $H_3BO_3$  (0; 0.056; 1.4; 2.8 and 5.6 mg L<sup>-1</sup>) and  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (0; 3.75; 7.5; 15 and 30 mg L<sup>-1</sup>) in all possible combinations. Additionally, this medium also contained 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 150 g L<sup>-1</sup> of banana pulp (obtained from the local cv. “nanica”). After 90 days, the best *in vitro* growth of orchids seedlings was obtained with the KC medium with concentrations of 1.4 mg L<sup>-1</sup>  $H_3BO_3$  and 15 mg L<sup>-1</sup>  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ .

**Key words:** ornamental plant; culture medium; *in vitro* growth, boron, manganese.

Recebido para publicação em julho de 2006 e aprovado em abril de 2009

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA) Cx. P. 3037, 37200-000 Lavras, MG. E-mail: migueiredo@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA) Cx. P. 3037, 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

<sup>3</sup> Departamento de Ciência dos Solos, Universidade Federal de Lavras (UFLA) Cx. P. 3037, 37200-000 Lavras, MG. E-mail: janicegc@ufla.br

## INTRODUÇÃO

As orquídeas são uma das plantas ornamentais mais cobiçadas, devido à exuberância de suas flores perfeitas. Por esse motivo, a prática extrativista para comercialização vem conduzindo algumas espécies à beira de extinção.

O emprego da técnica de micropropagação possibilita minimizar as coletas predatórias de orquídeas, aumentando as chances de manutenção das populações naturais dessas plantas. Além disso, a cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa quando aplicada a variedades que são de difícil propagação, possuem poucas sementes ou com germinação reduzida e que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala.

No cultivo e subcultivo de plântulas do gênero *Cattleya*, George *et al.* (1987) sugerem o meio KC de Knudson (1946) ou o de Reinert & Mohr (1967). Estes meios baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

Para que uma plântula se desenvolva normalmente, os elementos minerais devem se encontrar em disponibilidade no meio de cultura e em concentrações adequadas para as plantas. O excesso ou deficiência de um deles pode provocar um desequilíbrio fisiológico e nutricional que resultará em prejuízos para o desenvolvimento das plantas (Hernandez, 1998).

O Manganês (Mn) é um dos mais importantes microelementos e tem sido incluído na maioria dos meios de cultura de tecidos (Pasqual, 1998). É absorvido na forma de  $Mn^{2+}$  e é um elemento necessário na definição da estrutura de metaloproteínas envolvidas na respiração e fotossíntese (Clarkson & Hanson, 1980). É requerido para atividade de várias enzimas relacionadas à integridade da membrana do cloroplasto e para a liberação do oxigênio na fotossíntese (Macfie & Taylor 1992; Raven *et al.*, 1996; Santandrea *et al.*, 1998; Ferroni *et al.*, 2004; Lidon *et al.* 2004), tendo assim importante papel na reação de Hill no processo de respiração (Macfie *et al.* 1994). Segundo Camargo (1970), esse nutriente é também ativador de enzimas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos, com as reações de fosforilação e com o ciclo do ácido cítrico.

As funções do Boro (B) em cultura de tecidos também são diversas. Este micronutriente influencia na estrutura da membrana celular (Marschner, 1995, Hu *et al.*, 1996, Blevins & Lukaszewski, 1998; O'Neill *et al.*, 2001) e no metabolismo de polissacarídeos (Matoh & Kobayashi, 1998) e de ácidos nucléicos (Ali & Jarvis, 1988). É também requerido para o metabolismo de ácidos fenólicos e para a biossíntese de lignina (Lewis, 1980). A deficiência desse nutriente inibe a reação de Hill e a taxa de fotossíntese (Sharma & Ramchandra, 1990).

A preocupação com a conservação dos genótipos das orquídeas nativas levou à realização do presente trabalho, que tem por objetivo estudar o efeito do Boro e do Manganês na melhoria do meio de cultura Knudson para promover melhor eficiência na micropropagação de plântulas de *Cattleya loddigesii in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foram plântulas de *Cattleya loddigesii*, oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes pequenas ( $\pm 0,5$  cm).

Foram utilizadas diferentes concentrações salinas de  $H_3BO_3$  (0; 0,056; 1,4; 2,8 e 5,6  $mg L^{-1}$ ) e  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (0; 3,75; 7,5; 15 e 30  $mg L^{-1}$ ) da formulação de sais do meio KC em todas as combinações possíveis, perfazendo um fatorial 5 x 5, com quatro repetições e três frascos por parcela, em delineamento inteiramente casualizado.

O meio KC é constituído de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (1  $g L^{-1}$ ),  $(NH_4)_2SO_4$  (0,50  $g L^{-1}$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,25  $g L^{-1}$ ),  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (7,5  $mg L^{-1}$ ),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,062  $mg L^{-1}$ ),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,331  $mg L^{-1}$ ),  $H_3BO_3$  (0,056  $mg L^{-1}$ ),  $KH_2PO_4$  (0,25  $g L^{-1}$ ),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,026  $mg L^{-1}$ ),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (25  $mg L^{-1}$ ) e sacarose (20  $g L^{-1}$ ). Esse meio foi suplementado com carvão ativado (2  $g L^{-1}$ ), polpa de banana nanica (150  $g L^{-1}$ ) e ágar (5  $g L^{-1}$ ).

Os meios tiveram seu pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  e foram vertidos em frascos de vidro com capacidade para 250  $cm^3$ , contendo 60 mL de meio de cultura, que foram vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, foram inoculadas quatro plântulas de orquídea por frasco, que foram mantidas em sala de crescimento com irradiância em torno de 35  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 1^\circ C$  e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 90 dias. Após este período, o experimento foi avaliado em função das seguintes variáveis: comprimento das raízes, altura da parte aérea e massas de matéria fresca e seca das plântulas.

A análise de variância foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do software estatístico (SAS®, 1990) por meio do método dos quadrados mínimos ponderados pelo inverso das variâncias de cada tratamento, uma vez que esses apresentaram heterogeneidade de variâncias.

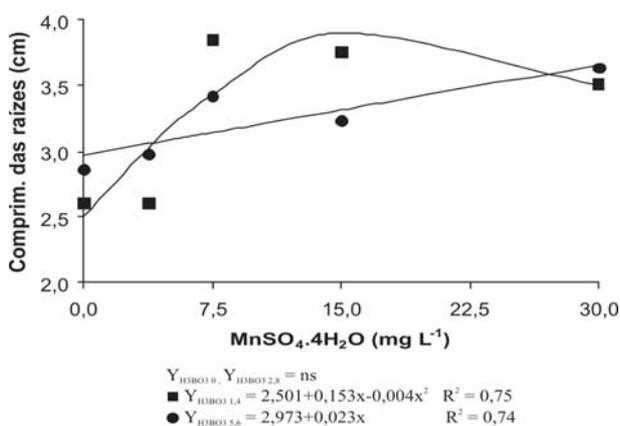
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maior comprimento de raiz (3,96 cm) foi obtido em plântulas quando se adicionou ao meio de cultura  $H_3BO_3$  na concentração de 1,4  $mg L^{-1}$  em combinação com 19,13  $mg L^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (Figura 1), havendo, a partir desse ponto, redução das taxas de crescimento do sistema radicular.

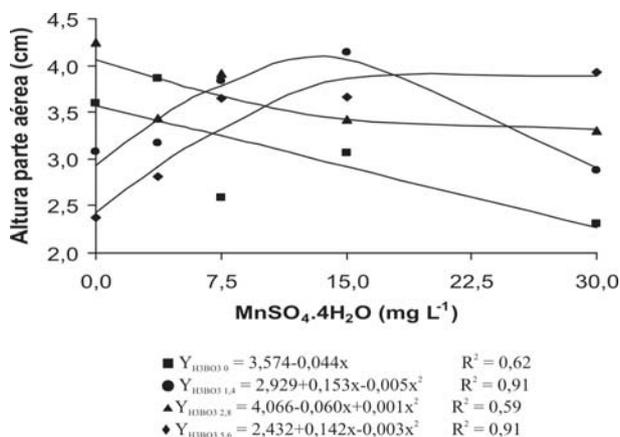
Esse resultado pode ser atribuído à possibilidade de um desbalanço nutricional entre os micronutrientes testados. Segundo alguns autores, micronutrientes podem tornar tóxicos se sua concentração for mais alta que um ponto crítico específico, podendo levar a interações negativas nos níveis celular e molecular (Walworth & Sumner, 1988; Hall, 2002).

É importante ressaltar que o melhor resultado foi obtido em uma concentração relativamente baixa de Boro. Segundo Kersten (1990), a presença de boro diminui o teor de AIA livre em raízes de trigo e milho. O boro tem a função de aumentar a atividade da enzima AIA-oxidase, sendo essa responsável pela degradação da principal auxina indutora do enraizamento (AIA) (Jarvis, 1983).

O melhor resultado para a altura da parte aérea (4,1 cm) foi obtido com a utilização de 1,4 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 15,3 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (Figura 2), a partir do qual houve redução das taxas de crescimento dessa variável. Observa-se ainda que incrementos nas concentrações de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O adicionadas ao meio KC na ausência de



**Figura 1.** Comprimento das raízes de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro*, durante 90 dias, em diferentes concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.

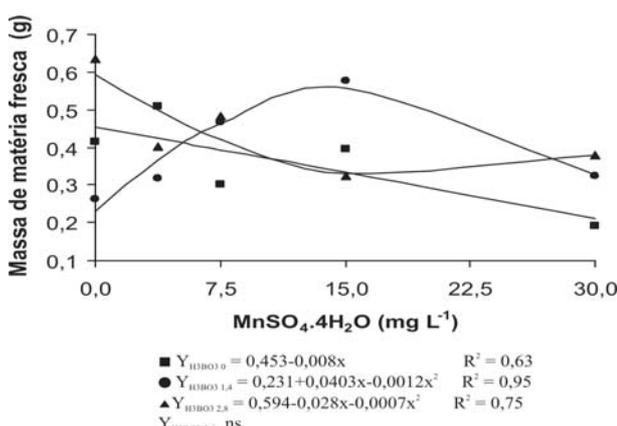


**Figura 2.** Altura da parte aérea de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro*, durante 90 dias, em diferentes concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.

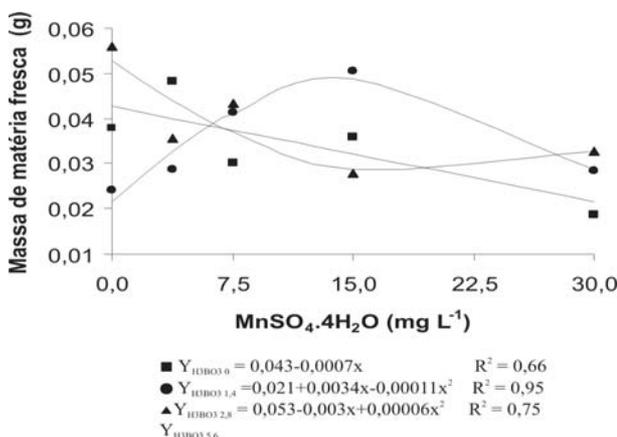
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> proporcionaram diminuição na altura de plântulas de *C. loddigesii* de forma linear.

Da mesma forma, Diniz *et al.* (1999) afirmam que as concentrações de Zn, Mn, Cu e B podem ser reduzidas no meio básico MS para o cultivo de explantes de bananeira. Petolino & Collins (1985) e Santandrea *et al.* (1997) observaram efeitos inibitórios do Manganês em concentrações mais altas no crescimento e na regeneração de planta em espécies de fumo.

Maiores massas de matéria fresca e seca de plântulas (0,59 e 0,053 g, respectivamente) foram verificadas com a utilização de 2,8 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> na ausência de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (Figuras 3 e 4), corroborando os dados das demais variáveis estudadas. Da mesma forma, menores valores de massas de matéria fresca e seca de plântulas foram observados com a utilização de altas concentrações de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (30 mg L<sup>-1</sup>) na ausência de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. O excesso de Mn induz inibição de síntese de clorofila e leva a um declínio no índice de fotossíntese (Clijsters & van Assche, 1985; Clairmont *et al.*, 1986; Macfie *et al.* 1994).



**Figura 3.** Massa de matéria fresca de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro*, durante 90 dias, em diferentes concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.



**Figura 4.** Massa de matéria seca de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro*, durante 90 dias, em diferentes concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.

Há também que se considerar que a disponibilidade do Mn no meio de cultura é influenciada pela coprecipitação com sais de fosfato (Klein & Manos, 1960), pela concentração de ágar no meio (Singha *et al.*, 1985) e pelas concentrações de K, Ca, Mg, Cu, Zn e Na (Malavolta *et al.* 1989).

Vale ressaltar que nas variáveis estudadas, de maneira geral, os melhores resultados foram obtidos em concentrações maiores de Boro e Manganês que a concentração usual de meio KC, que é de  $0,056 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_3BO_3$  e de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ . Esses resultados mostram a importância em se estabelecer um novo protocolo otimizando o meio de cultura KC, visando ao crescimento adequado de plântulas de orquídea da espécie *Cattleya loddigesii*.

## CONCLUSÃO

A utilização de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $H_3BO_3$  e  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  da formulação original desses sais, no meio Knudson C (KC), proporciona melhor crescimento *in vitro* em plântulas de orquídea da espécie *Cattleya loddigesii*.

## REFERÊNCIAS

- Ali AHN & Jarvis BC (1988) Effects of auxin and boron on nucleic acid metabolism and cell division during adventitious root regeneration. *New Phytology*, 108:383-391.
- Blevins DG & Lukaszewski KM (1998) Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:481-500.
- 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*, 1<sup>nd</sup> ed. Brasília, EMBRAPA. p. 87-132.
- Camargo PN (1970) *Princípios de nutrição foliar*. São Paulo, Agro-nômica Ceres. 118p.
- Clairmont KB, Hagar WG & Davis EA (1986) Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus. *Plant Physiology*, 80:291-293.
- Clarkson DT & Hanson JB (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31:239-298.
- Clijsters H & van Assche F (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7:31-40.
- Diniz JDN, Hernandez FFF, Gonçalves NA & Torres AC (1999) Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:1385-1391.
- Ferroni L, Baldisserotto C, Fasulo MP, Pagnoni A & Pancaldi S (2004) Adaptive modifications of the photosynthetic apparatus in *Euglena gracilis* Klebs exposed to manganese excess. *Protoplasma*, 224:67-177.
- George EF, Puttock DJM & George HJ (1987) *Plant culture media: formulations and uses*. 1<sup>nd</sup> ed., Edington, Exegetics. 567p.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53:1-11.
- Hernandez RJM (1998) Efeito da aplicação de fosfato monoamônico e sulfato de zinco sobre a nutrição mineral do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em condições de dois níveis de saturação por bases. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 151p.
- Hu H, Brown PH & Labavitch MJ (1996) Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*, 47:227-232.
- Jarvis BC (1983) Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. *The New Phytologist*, 95:509-518.
- Kersten E (1990) Efeito do boro, zinco e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de dois cultivares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 111p.
- Klein RM & Manos GE (1960) Use of metal chelates for plant tissue cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 88:416-425.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14:214-17.
- Lewis DH (1980) Boron, lignification and the origin of vascular plants – a unified hypothesis. *New Phytology*, 84:209-229.
- Lidon FC, Barreiro MG, Ramalho C (2004) Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *Journal of Plant Physiology* 161:1235-1244.
- Macfie SM & Taylor GJ (1992) The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. *Physiologia Plantarum*, 85:467-475
- Macfie SM, Cossins EA & Taylor GJ (1994) Effects of excess manganese on production of organic acids in Mn-tolerant and in Mn-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. (wheat). *Journal of Plant Physiology*, 143:135-144
- Malavolta E, Vitti GC & Oliveira SA de (1989) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba, NAGY. 319p.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. London, Academic Press. 889p.
- Matoh T & Kobayashi M (1998) Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *Journal of Plant Research*, 111:179-190.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P & Darvill AG (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294:846-849.
- Pasqual M (1998) *Meios de cultura*. Lavras, UFLA/FAEPE. 127p.
- Petolino JF & Collins GB (1985) Manganese toxicity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) callus and seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 118:139-144
- Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE (1996) *Biologia vegetal*. 5<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 728p.
- Reinert RA & Mohr HC (1967) Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 91:664-671.
- Santandrea G, Schiff S & Bennici A (1997) Manganese toxicity to different growth processes *in vitro* in *Nicotiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50:125-129.
- Santandrea G, Schiff S & Bennici A (1998) Effects of manganese on *Nicotiana* species *in vitro* and characterization of regenerated Mn-tolerant tobacco plants. *Plant Science*, 132:71-82.
- SAS Institute SAS/ STAT. SAS/GLM (1990) *Software: usage and reference version 6.12*. Cary. 501p.
- Sharma PN & Ramchandra T (1990) Water relations and photosynthesis in mustard plants subjected to boron deficiency. *Indian Journal of Plant Physiology*, 33:150-154.
- Singha S, Townsend EC & Oberly GH (1985) Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110:407-411.
- Walworth JL & Sumner ME (1988) Foliar diagnosis: A review. *Advances in Plant Nutrition* 3:193-241.