

# Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico

Aparecida Gomes de Araújo<sup>1</sup>, Moacir Pasqual<sup>2</sup>, Felipe Almendagna Rodrigues<sup>3</sup>, Joyce Dória Rodrigues<sup>4</sup>, Evaristo Mauro de Castro<sup>5</sup>, Adriene Matos Santos<sup>6</sup>

## RESUMO

A manipulação da composição do meio de cultura, assim como das condições de cultivo, pode otimizar a propagação *in vitro* de plantas de orquídeas, sendo, portanto, uma maneira viável de aumentar a qualidade das mudas micropropagadas. Com o objetivo de estudar o crescimento *in vitro* de plantas de *Cattleya loddigesii* Lindl., avaliaram-se diferentes espectros luminosos (branca, amarela, azul, verde e vermelha), associados com concentrações de ácido giberélico (0; 2,5; 5; 10; e 20 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>). Plantas medindo aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em frascos contendo 60 mL de meio WPM modificado, conforme os tratamentos. O meio teve o pH previamente ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado. Decorridos 90 dias da inoculação, verificou-se que para número de brotos não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para número de raízes e massa fresca de plantas, foi observado que, na ausência de giberelina, ocorreu aumento dessas variáveis. Melhores respostas para comprimento de parte aérea e de raízes foram registradas na ausência do GA<sub>3</sub> e cultivo sob celofane vermelho e em sala de crescimento (luz branca), respectivamente. O maior número de folhas foi obtido em plantas cultivadas sob celofane azul. Assim, pode-se concluir que o cultivo em sala de crescimento sob celofane vermelho aumenta o alongamento das plantas e a presença de GA<sub>3</sub> interfere negativamente no crescimento *in vitro* de plantas de *C. loddigesii*.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, luminosidade, giberelina, cultura de tecidos.

## ABSTRACT

### *In vitro* growth of *Cattleya loddigesii* Lindl. under different light spectra and gibberellic acid doses

The manipulation of the culture medium composition and the conditions of cultivation can optimize the *in vitro* propagation of orchids, thus consisting in a viable way to increase the quality of micropropagated plants. In order to study the *in vitro* growth of *Cattleya loddigesii*, different light spectra (white, yellow, blue, green and red) associated with the concentrations of gibberellic acid (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) were evaluated. Plants measuring approximately 1 cm in length, were inoculated in bottles containing 60 mL of modified WPM medium, according to the treatments. The medium was previously adjusted to pH 5.7 ± 0.1 and autoclaved. After 90 days of inoculation, the number of shoots showed no significant difference between treatments. Number of roots and fresh weight of plants increased in the absence of gibberellin. Best responses for length of shoot and root length were recorded in the absence of GA<sub>3</sub> and red cellophane and under cultivation in a growth room (white light), respectively. The highest number of leaves was obtained in plants grown under blue cellophane. Thus we can conclude that the cultivation in a growth room under red cellophane increases the elongation of plants and the presence of GA<sub>3</sub> interfere negatively in the growth of *in vitro* *Cattleya loddigesii*.

**Key words:** Orchidaceae, light, gibberellin, tissue culture.

Recebido para publicação em abril de 2008 e aprovado em junho de 2009

<sup>1</sup>Engenheira Agrônoma, Doutora. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, agaraujo2003@hotmail.com

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, mpasqual@dag.ufla.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, filipealmendagna@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, joycerodrigues01@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Engenheiro Florestal, Doutor. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, emcastro@dbi.ufla.br

<sup>6</sup>Engenheira Agrônoma. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, amsagro@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A realização de propagação vegetativa utilizando técnicas de cultivo *in vitro* pode ser valioso instrumento na multiplicação rápida de mudas de orquídeas, uma vez que o processo convencional é extremamente lento (Pasqual, 2001a).

A composição do meio de cultura e a concentração dos reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento das plantas, a exemplo do ácido giberélico ( $GA_3$ ), que comumente não é incluído nos meios de cultivo, em razão do suprimento endógeno ser suficiente para os processos morfogênicos (Caldas *et al.*, 1998). Entretanto, quando as plantas que foram produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas, devido ao seu tamanho reduzido, o cultivo na presença de  $GA_3$  pode provocar o alongamento das regiões vegetativas em algumas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998) e, conseqüentemente, maior número de indivíduos poderá ser aclimatizado, diminuindo o período de permanência do material vegetal *in vitro*.

Em plantas como macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.], a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de  $GA_3$  proporcionou crescimento satisfatório dos explantes (Diniz *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues *et al.* (2007), em *Cattleya loddigesii*, sendo as melhores respostas para comprimento de plântulas obtidas em meio Knudson C, acrescido com 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico, contendo três plantas/frasco. No entanto, Soares *et al.* (2009), estudando diferentes concentrações de sais do meio Knudson C e ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plantas de orquídeas, verificaram que, para *C. loddigesii*, o meio Knudson C (100% de sais) proporcionou maior multiplicação e para *Hadrolaelia lobata* x *Hadrolaelia purpurata* a concentração do meio Knudson C influenciou o número de folhas (200% de sais) e de brotos (50% de sais). Os mesmos autores observaram também que não houve efeito do  $GA_3$  no número de brotos, comprimento de parte aérea e matéria fresca para os dois genótipos.

O espectro da luminosidade utilizada nas salas de crescimento é também de suma importância na morfogênese *in vitro*. Em estudos do desenvolvimento *in vitro* de brotos de ameixeira (*Prunus* sp.), a luz azul aumentou o número de brotos axilares produzidos a partir do meristema apical, enquanto a luz vermelha promoveu crescimento caulinar (Muleo *et al.*, 2001).

Braga *et al.* (2009), estudando o efeito da qualidade de luz em crisântemo [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.] micropropagado, verificaram que o cultivo em sala de crescimento, sem uso de malhas, foi mais eficiente na emissão de folhas, raízes e brotações e também no alongamento de raízes e de parte aérea.

Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito do espectro de luz no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto, esses têm demonstrado que o espectro de luz influencia a eficiência biológica dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos (Erig & Schuch, 2005).

Com o objetivo de otimizar o crescimento *in vitro* de plântulas de *C. loddigesii*, foram avaliados diferentes espectros de luz associados a diferentes concentrações de ácido giberélico ( $GA_3$ ).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como explantes plantas de *C. loddigesii* oriundas de sementes germinadas *in vitro*, provenientes da autofecundação, medindo aproximadamente 1 cm de comprimento, correspondendo à parte aérea e às raízes.

Após um ensaio prévio, determinou-se que o melhor meio para essa espécie é o WPM (Lloyd & McCown, 1980), o qual foi suplementado com diferentes concentrações de  $GA_3$  (0; 2,5; 5,0; 10; e 20 mg L<sup>-1</sup>), acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana 'Nanica' madura, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Verteram-se 60 mL de meio em frascos de vidro com capacidade para 250 cm<sup>3</sup>, vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos contendo cinco plântulas cada foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de aproximadamente 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

As plantas contidas no frasco foram submetidas a diferentes espectros de luz: branca (sala de crescimento convencional), azul, amarela, verde e vermelha, obtidas com a utilização de duas folhas de papel celofane envolvendo os frascos de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, com três repetições de cinco plantas cada. Decorridos 90 dias da instalação do experimento, avaliaram-se o número de folhas, número de brotos, número e comprimento de raízes (cm), comprimento da parte aérea (cm) e massa fresca das plantas (g). Os dados foram analisados empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 1999), por meio de regressão polinomial para concentrações de  $GA_3$  e teste Scott-Knott a 5% de probabilidade para os diferentes espectros de luz.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

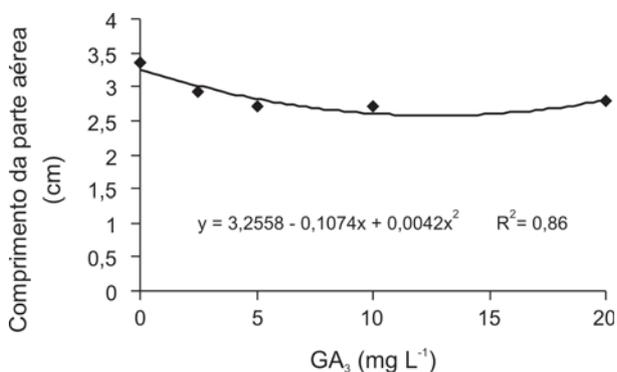
Não houve interação significativa entre os fatores estudados para qualquer uma das variáveis analisadas. O

comprimento da parte aérea e o de raízes apresentaram significância dos fatores estudados isoladamente, enquanto as variáveis número de raízes e massa fresca das plantas tiveram significância apenas para o fator GA<sub>3</sub>. Avaliando o número de folhas, houve significância apenas para o fator luz, e o número de brotos não foi afetado pelos tratamentos (Tabela 1).

No presente trabalho os resultados para número de brotos assemelham-se àqueles obtidos por Soares *et al.* (2009), que, trabalhando com orquídeas (*C. loddigesii* e *H. lobata* x *H. purpurata*), observaram que não houve diferença significativa entre as doses de GA<sub>3</sub> utilizadas. O GA<sub>3</sub> adicionado ao meio de cultura normalmente diminui ou impede a formação de raízes, brotações ou embriões somáticos (Pasqual, 2001b).

Melhores respostas para comprimento de parte aérea foram registradas na ausência do regulador de crescimento (3,26 cm) (Figura 1). Resultado similar foi encontrado em orquídeas (*C. loddigesii* e *H. lobata* x *H. purpurata*) por Soares *et al.* (2009). A incorporação de GA<sub>3</sub> ao meio WPM teve pouca influência no desenvolvimento da parte aérea, e as doses crescentes de GA<sub>3</sub> reduziram gradativamente o comprimento da parte aérea em *C. loddigesii*.

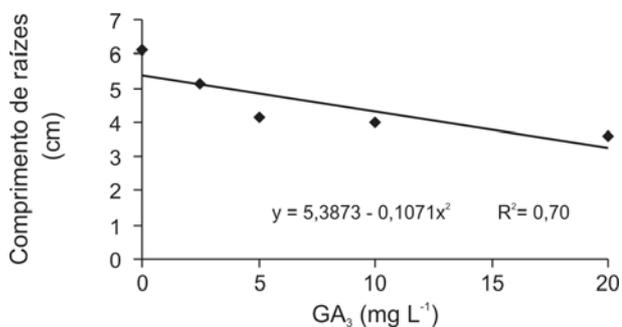
Por outro lado, em estudos com orquídeas *Laeliocattleya Irene Finney* x *Cattleya walkeriana* e *C. loddigesii*, melhores respostas para altura de plantas



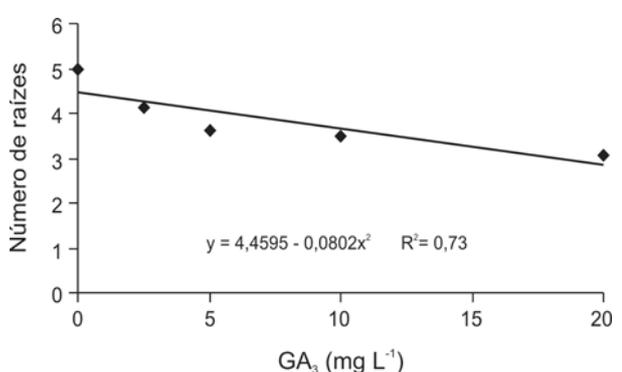
**Figura 1.** Comprimento de parte aérea (cm) em plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>.

foram obtidas em meio WPM e Knudson C com 10 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (Araujo *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007; respectivamente), bem como em *Cattleya aclandiae* Lindl. com a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> associado a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Moreira *et al.*, 2005). O alongamento de parte aérea e brotações laterais pode ser afetado em diferentes faixas do espectro pela alteração da concentração endógena de auxinas e giberelinas nas plantas (Silva & Debergh, 1997).

Quanto ao número e comprimento de raízes e à massa fresca de plantas, foi observado que na ausência de giberelina ocorreu aumento dessas variáveis, 4,46; 5,39 cm; e 0,376 g, respectivamente, e doses crescentes do fitorregulador influenciaram negativamente em seu desenvolvimento. (Figuras 2, 3 e 4).



**Figura 2.** Comprimento de raízes (cm) em plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>.



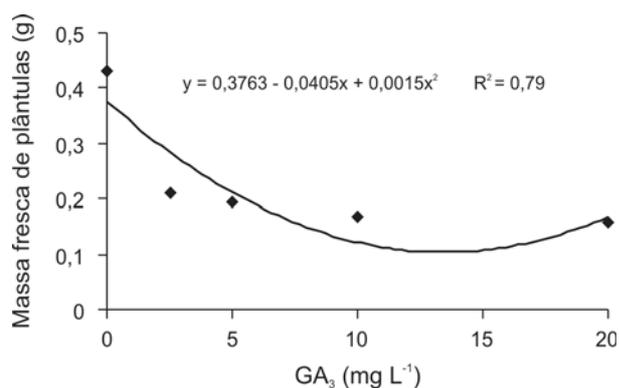
**Figura 3.** Número de raízes em plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>.

**Tabela 1.** Análise de variância referente ao crescimento e desenvolvimento das plantas de *Cattleya loddigesii* submetidas à diferentes espectros de luz associados com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>. Variáveis analisadas: número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e massa fresca de plântulas (MFP).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MFP
Luz	4	22,5495*	1,0581 <sup>ns</sup>	2,5383**	1,7198 <sup>ns</sup>	2,6541*	0,0101 <sup>ns</sup>
GA <sub>3</sub>	4	17,7822 <sup>ns</sup>	1,1035 <sup>ns</sup>	1,0550*	8,2965*	15,4667**	0,1915*
Luz x GA <sub>3</sub>	16	7,3339 <sup>ns</sup>	0,6552 <sup>ns</sup>	0,2920 <sup>ns</sup>	1,0027 <sup>ns</sup>	1,3131 <sup>ns</sup>	0,0173 <sup>ns</sup>
Resíduo	50	7,7922	0,4596	0,3144	0,7465	0,8733	0,0098
CV (%)		31,28	32,82	19,35	22,38	20,37	42,58

\*\* , \* significativos, a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo



**Figura 4.** Massa fresca de plantas (g) de *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de giberelina.

De forma similar, Araujo *et al.* (2005), testando GA<sub>3</sub> em *Laeliocattleya* Irene Finney x *C. walkeriana*, e Soares *et al.* (2009), em *C. loddigesii* e *H. lobata* x *H. purpurata*, verificaram melhores resultados para a produção de massa fresca de plantas na ausência desse regulador de crescimento.

Para que se obtenha sucesso no processo de micropropagação, é necessário ajustar, para cada espécie e, ou cultivar, as melhores condições de cultivo (Zimmerman, 1981), ou seja, concentrações mais apropriadas de reguladores de crescimento e ambiente no qual serão mantidos os explantes.

O maior número de folhas (11,07) foi verificado quando as plantas foram cultivadas sob papel celofane azul (Tabela 2). Já Erig & Schuch (2004) registraram que o cultivo de macieira sob celofane vermelho em sala de crescimento com 4,4 µM de BAP adicionado ao meio de cultura possibilitou a obtenção de maior número de gemas e taxa de multiplicação nos cultivares Matergala e Galaxy e, conseqüentemente, maior número de folhas.

Dignart (2006) não observou diferenças significativas para número de folhas de *C. walkeriana* em sala de crescimento, independentemente da utilização de malhas fotoconversoras coloridas (vermelha e azul). No entanto, Silva & Debergh (1997) verificaram diferenças para essa variável em tratamentos de alteração de qualidade espectral em plântulas de *Azorina vidalii* (H.C. Wats.) Feer.

As plantas apresentaram maior crescimento em altura (3,61 cm) sob cultivo em celofane vermelho (Tabela 2). Resultados distintos foram encontrados por Erig & Schuch (2004), que registraram melhores resultados para número e comprimento de brotos no cv. Matergala de macieira sob cultivo em celofane amarela. Já na cv. Galaxy, a qualidade de luz não alterou esse parâmetro.

A radiação vermelha, de modo geral, promove alongamento de parte aérea, como já constatado em diversos estudos (Silva & Debergh, 1997; Marks & Simpson, 1999). No entanto, muitos autores afirmam que a influência da qualidade de luz sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas está fortemente associada à espécie vegetal (Antonopolou *et al.*, 2004; Hunter & Burritt, 2004).

Segundo George (1996), a luz vermelha estimula o enraizamento em muitas espécies, porém, neste trabalho, o comprimento de raízes foi significativamente positivo apenas sob luz branca (5,25 cm), mas a qualidade de luz não influenciou o número de raízes, em crisântemo fato também constatado por Braga *et al.* (2009).

Estes resultados concordam com os de Antonopolou *et al.* (2004), que encontraram melhores resultados nos parâmetros de enraizamento sob radiação branca, isso porque as folhas irradiadas com luz branca absorvem mais os comprimentos de ondas azul, vermelha e verde, necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos.

No presente trabalho, a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura interferiu negativamente no desenvolvimento do sistema radicular e no acúmulo de biomassa das plantas. O cultivo sob celofane vermelho induziu o alongamento de parte aérea, e o cultivo em sala de crescimento (luz branca), o crescimento de raiz.

## CONCLUSÃO

O cultivo em sala de crescimento sob celofane vermelho aumenta o alongamento e a presença de GA<sub>3</sub> interfere negativamente no crescimento *in vitro* das plantas de *Cattleya loddigesii*.

**Tabela 2.** Número de folhas, comprimento de raízes e da parte aérea de plantas de *Cattleya loddigesii*, cultivadas sob diferentes espectros de luz.

Qualidade de luz	Número de folhas	Comprimento de raízes (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)
Amarela	8,56 b	4,24 b	2,78 b
Azul	11,07 a	4,59 b	2,74 b
Branca	7,96 b	5,25 a	2,54 b
Verde	8,64 b	4,66 b	2,82 b
Vermelha	8,40 b	4,20 b	3,61 a
CV (%)	31,28	20,37	19,35

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## REFERÊNCIAS

- Antonopolou C, Dimassi K, Therios I & Chatzissavvidis C (2004) The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. *Biologia Plantarum*, 48:549-553.
- Araujo AG, Pasqual M, Rodrigues FA, Rodrigues VA & Ferreira AL (2005) Meios de cultura e GA<sub>3</sub> no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. Fortaleza, Horticultura Brasileira. (Suplemento) p.612.
- Braga FT, Pasqual M, Castro EM de, Dignart SL, Biagiotti G & Porto JMP (2009) Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. *Ciência Agrotecnologia*, 33:502-508
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas, LS & Buso JA (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPq. p.87-132.
- Dignart SL (2006) Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 132p.
- Diniz JDN, Almeida JA, Teixeira AA, Gomes ED & Hernandez FF (2003) Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciência e Agrotecnologia*, 27:934-938.
- Erig AC & Schuch MW (2004) Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade de luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12:151-155.
- Erig AC & Schuch MW (2005) Tipo de luz na micropropagação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27:488-490.
- Ferreira DF (1999) SISVAR 4.3 - Sistema de análises estatísticas. (Software estatístico). Lavras, UFLA.
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture, part 1 - The technology. 2nd. Edington, Exegetics Limited. 1574p.
- Grattapaglia D & Machado M (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPq. p.183-260.
- Hunter DC & Burritt DJ (2004) Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40:215-220.
- Lloyd G & McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, 30:421-427.
- Marks TR & Simpson SE (1999) Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 28:133-142.
- Moreira MJS, Bastos LP, Teles S, Costa MAPC & Almeida WAB (2005) Efeito de giberelina e auxina no alongamento *in vitro* de *Cattleya aclandae*. Fortaleza, Horticultura Brasileira (Suplemento) p.655.
- Muleo R, Morini S & Casano S (2001) Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, 37:609-617.
- Pasqual M (2001a) Introdução: Fundamentos básicos. Curso de especialização à distância Cultura de Tecidos Vegetais (CTV). Lavras, UFLA/FAEPE. 97p.
- Pasqual M (2001b) Meios de cultura. Curso de especialização à distância Cultura de Tecidos Vegetais (CTV). Lavras, UFLA/FAEPE. 74p.
- Rodrigues JD, Araujo AG de, Pasqual M, Ferreira EA, Rocha HS & Rodrigues FA (2007) Ácido giberélico e número de explantes na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 3:78-82.
- Silva MH & Debergh PC (1997) The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:187-193.
- Soares JDR, Araújo AG de, Pasqual M, Rodrigues FA & Assis FA de (2009) Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Ciência Rural*, 39:772-777.
- Zimmerman RH (1981) Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae*, 120:217-222.