

Desenvolvimento de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético e benziladenina

Monique Cristine Rodrigues Abrão⁽¹⁾, Jackeline Jorge⁽¹⁾ & Rogério Mamoru Suzuki⁽¹⁾

⁽¹⁾ Núcleo de Pesquisa - Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

E-mail para contato: monique_cristine13@yahoo.com.br

Resumo: *Cattleya loddigesii* Lindl. é uma espécie endêmica da Mata Atlântica e atualmente encontra-se em declínio populacional nas florestas do Estado de São Paulo. O presente estudo analisou a influência de diferentes balanços de ácido naftalenoacético e benziladenina no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii*. Foram utilizadas 15 plântulas com um ano de cultivo *in vitro*. Ao meio de cultura Murashige & Skoog (MS) foram adicionados balanços de ácido naftalenoacético (ANA; 0,57 e 2,28 μ M) e benziladenina (BA; 0,57 e 2,28 μ M). Após 180 dias de cultivo *in vitro* foram analisados parâmetros biométricos, onde dez plântulas de cada meio de cultura foram retiradas para avaliar o comprimento caulinar, comprimento da raiz maior, número de folhas e raízes vivas, bem como as massas de matéria fresca e seca de caules e raízes. O meio de cultura com menor balanço de auxina e citocinina (0,57 μ M ANA+0,57 μ M BA) promoveu o crescimento tanto do caule quanto da raiz, além de estimular maior matéria fresca caulinar. O meio com maior concentração de ambos reguladores de crescimento (2,28 μ M ANA+2,28 μ M BA) apresentou maior acúmulo de matéria seca de caule e raiz, e maior matéria fresca caulinar, evidenciando para *C. loddigesii* que as concentrações de auxina e citocinina são determinantes para o desenvolvimento, mas é essencial que as concentrações destes dois fitormônios sejam equivalentes.

Palavras-Chave: conservação, cultivo *in vitro*, reguladores de crescimento, orquídea

INTRODUÇÃO

As orquídeas compreendem uma das mais diversas famílias com flores do mundo, sendo a família Orchidaceae composta por aproximadamente 800 gêneros e 25.000 espécies

(Atwood 1986, Chase *et al.* 2003), além disso, há mais de 150.000 híbridos cultivados (RHS 2012).

Cattleya loddigesii Lindley (Fig. 1) é uma espécie epífita, distribuída nos estados do sudeste brasileiro e no Paraná. Possui inflorescência com até oito flores, que possuem coloração rosa que varia da tonalidade lavanda claro ao escuro, coerulea ou branca e um halo branco ou creme em seu labelo, que exala um suave perfume durante o entardecer (Braem, 1984). Apresenta grande atrativo comercial.



Figura 1. Aspecto geral da flor de *Cattleya loddigesii* Lidley.

Atualmente as orquídeas sofrem uma grande ameaça de extinção, pois além da devastação de seu hábitat, possuem um ciclo de vida complexo, no qual necessitam da associação com fungos micorrízicos para germinação de suas sementes na natureza; apresentam crescimento lento e um longo período juvenil até atingir o estágio floral (Ferreira & Suzuki 2008), tornando assim o cultivo

in vitro alternativa eficaz para a conservação (Arditti 1967).

No cultivo *in vitro* os reguladores de crescimento também têm sido uma alternativa para promover a germinação e o desenvolvimento de orquídeas (Hadley & Harvais 1968). O clássico experimento de Skoog & Miller (1957) que evidenciou a importância da relação entre auxinas e citocininas na organogênese *in vitro*, na dominância apical, formação e crescimento de raízes e brotos caulinares, iniciou uma série de estudos envolvendo ambos os hormônios na micropropagação de orquídeas e outras plantas (Suzuki & Ferreira 2007).

O declínio populacional crescente de *Cattleya loddigesii*, além da inexistência de estudos referentes a sua reprodução, ratificam a importância de otimizar seu crescimento, permitindo a conservação desta espécie e possibilitando à reintrodução na natureza.

MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas de *Cattleya loddigesii* foram obtidas por sementeira *in vitro* a partir da reprodução utilizando matrizes pertencentes à coleção científica do Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica.

O meio de cultura basal (controle) foi o meio Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962). Os tratamentos consistiram de oito diferentes balanços de auxina (α - ácido naftalenoacético - ANA) e citocinina (6-benziladenina - BA). As concentrações utilizadas de ANA foram: 0,57 e 2,28 μM ; de BA: 0,57 e 2,28 μM . E os balanços: 0,57 μM ANA+0,57 μM BA ou 2,28 μM BA e 2,28 μM ANA+0,57 μM BA ou 2,28 μM BA. Todos os meios foram suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 0,4% de ágar bacteriológico, o pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram esterilizados em autoclave a 117,7 kPa e 121 ° C durante 15 min.

Após 180 dias de cultivo, dez plantas de cada meio de cultura foram retiradas aleatoriamente para avaliar o comprimento caulinar (medido da base do caulículo até a extremidade da folha maior), comprimento da raiz maior, número de folhas e raízes, massas de matéria fresca e seca de caules (incluindo folhas) e raízes. A matéria seca foi obtida mantendo as plantas em estufa de secagem à 60°C, durante uma semana.

Análise estatística

Após a avaliação os resultados biométricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias utilizando-se o

teste Tukey em nível de 5% de significância, com o Software SPSS 11.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao término de 180 dias de cultivo, as análises biométricas efetuadas nas plantas demonstraram que o comprimento caulinar foi maior nas plantas cultivadas no meio com menor concentração de auxina e citocinina, 0,57 μM ANA+0,57 μM BA (2,2 cm). Em estudo realizado com *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. (Hossain *et al.* 2010) foi demonstrado que concentrações equivalentes de auxina e citocinina induziram caules maiores. O balanço que inibiu o desenvolvimento caulinar das plantas foi 0,57 μM ANA (1,6 cm), sem a adição de BA (figura 1A); possivelmente devido à ausência de citocinina essencial na promoção da divisão celular e do desenvolvimento do apical caulinar (Lexa 2003).

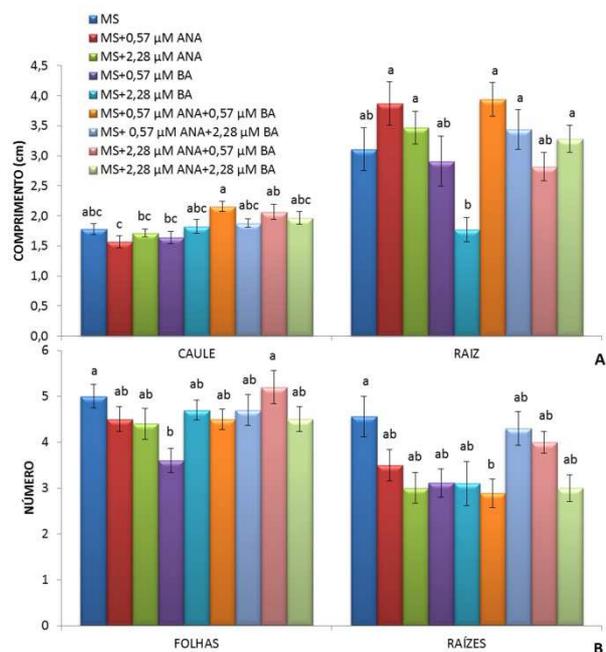


Figura 2. Efeitos de ácido naftalenoacético e benziladenina no comprimento do caule e da raiz (A), no número de folhas e raízes (B) de *Cattleya loddigesii*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ($n=10$).

O crescimento radicular foi igualmente influenciado pelo meio de cultura com adição de 0,57 μM ANA+0,57 μM BA (3,9 cm), no entanto o

meio com 0,57 μM de ANA também foi igualmente eficaz (3,9 cm) diferentemente ao verificado para o comprimento caulinar das plantas, em que o meio com 0,57 μM de ANA foi inibitório ao desenvolvimento. A eficácia demonstrada em *C. loddigesii* pelo meio que possui somente auxina está em consonância com a função desempenhada pela auxina de promover o alongamento e divisão celular das raízes (Casimiro *et al.* 2001). O crescimento das raízes foi inibido quando as plantas foram cultivadas no meio de cultura com a maior concentração de BA, 2,28 μM isoladamente (1,8 cm) (figura 2A). Segundo Ori *et al.* (2014) o balanço equitativo de auxina/citocinina tende a promover o desenvolvimento de caule e raízes como o observado nas plantas cultivadas em 0,57 μM ANA+0,57 μM BA.

A formação de folhas não variou significativamente com a adição dos reguladores de crescimento quando comparado ao controle (MS; 5 folhas). Foi maior no meio 2,28 μM ANA+ 0,57 μM BA e menor no meio 0,57 μM BA. O número de raízes não foi influenciado significativamente pela ação dos hormônios vegetais em relação ao controle (5 raízes) (figura 2B).

A massa de matéria fresca caulinar foi estimulada nas plantas cultivadas no meio 0,57 μM ANA+0,57 μM BA (69,5 mg) e a menor massa de matéria fresca foi encontrada nas plantas cultivadas em 0,57 μM BA (27,4) (figura 3A); diferentemente do verificado em *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi. por Vogel & Macedo (2010) em que a menor concentração de citocinina utilizada (thidiazuron- TDZ; 1 μM) foi a que apresentou maior matéria fresca após 4 meses de cultivo.

A massa de matéria fresca radicular foi promovida em todos os balanços que continham ANA+BA, embora apenas o meio contendo 2,28 μM ANA+2,28 μM BA tenha sido significativamente maior que o controle (132,0 mg) (figura 3A).

As plantas com as maiores massas de matéria seca caulinar foram encontradas no meio 0,57 μM ANA+0,57 μM BA (5,9 mg). As plantas que apresentaram a maior matéria seca radicular foram aquelas crescidas no meio 2,28 μM ANA+2,28 μM BA (8,7 mg), já o menor acúmulo de matéria seca radicular foi observado nas plantas crescidas no meio 2,28 μM BA (3,0 mg) (figura 3B).

CONCLUSÕES

O meio de cultura com menor balanço de auxina e citocinina (0,57 μM ANA+0,57 μM BA) promoveu o crescimento tanto caulinar quanto radicular, além de maior matéria fresca caulinar. O

meio com maior concentração de ambos reguladores de crescimento (2,28 μM ANA+2,28 μM BA) apresentou maior acúmulo de matéria seca de caule e raiz, e maior matéria fresca caulinar. Em *C. loddigesii* verificou-se que as concentrações fornecidas de auxina e citocinina são determinantes para o desenvolvimento, mas é essencial que estas sejam equivalentes para promoção diferencial do parâmetro biométrico que se deseja estimular.

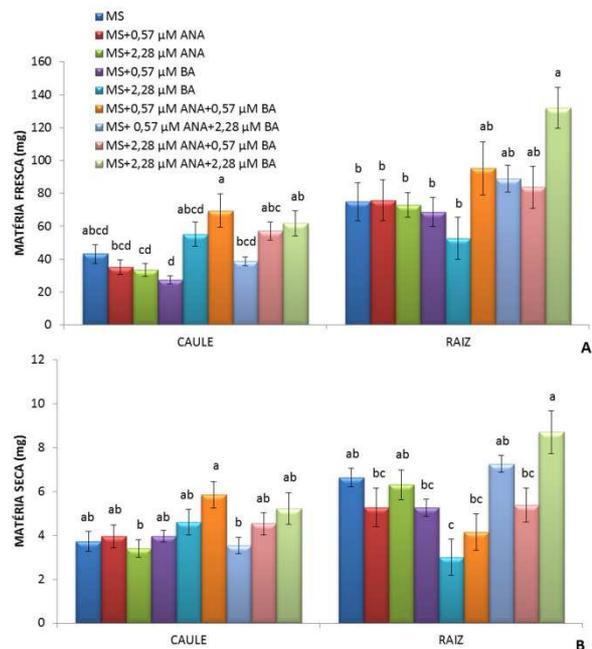


Figura 3. Efeitos de ácido naftalenoacético e benziladenina na massa de matéria fresca (A) e seca (B) de caules e raízes de *Cattleya loddigesii*. Colunas com barras representando erro padrão e letras diferentes demonstrando variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (n=10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arditti, J.** 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* 33:1–97.
- Atwood, J.T.J.** 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9:171–186.
- Casimiro, I., Marchant, A, Bhalerao, R.P., Beekman, T., Dhooze, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J. & Bennett, M.** 2001. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant cell* 13:843–52.

- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V.** 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *In*: K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb (eds). *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, pp. 69–89.
- Ferreira, W.M. & Suzuki, R.M.** 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. *In*: M.I.B. Lioiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston (eds). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal, pp. 67–68.
- Hadley, G. & Harvais, G.** 1968. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist* 67:441–445.
- Hossain, M.M., Sharma, M., Teixeira Da Silva, J. A. & Pathak, P.** 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae* 123:479–487.
- Kefford, N.P. & Goldacre, P.L.** 1961. The changing concept of auxin. *American Journal of Botany* 48:643–650.
- Lexa, M.** 2003. Dynamics of endogenous cytokinin pools in Tobacco seedlings: a Modelling Approach. *Annals of Botany* 91:585–597.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.
- Ori, S.S., Chu, E.P. & Tavares, A.R.** 2014. Effects of auxins on *in vitro* reserve compounds of *Phalaenopsis amabilis* (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology* 13:1467–1475.
- RHS.** 2012. International register and checklist of orchid hybrids (Sander's list) Royal Horticultural Society. Disponível em <https://www.rhs.org.uk/about-the-rhs/pdfs/publications/orchid-hybrid-lists/2012-april-june>> Acessado em 11-08-2014.
- Skoog, F. & Miller, C.O.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11:118–131.
- Su, Y.-H., Liu, Y.-B. & Zhang, X.-S.** 2011. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant* 4:616–25.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Lobakova, E.S., Kolomeitseva, G.L. & Netrusov, A. I.** 2001. Microbiota of the Orchid rhizoplane. *Microbiology* 70:492–497.
- Vogel, I.N. & Macedo, A.F.** 2010. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104:147–155.