

Concentrações de silício e GA₃ na propagação *in vitro* de orquídea em condição de luz natural

JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES¹; FABÍOLA VILLA^{2*}; FILIPE ALMENDAGNA RODRIGUES¹; MOACIR PASQUAL¹

¹Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras/MG

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 91, CEP 85.960-000, Marechal Cândido Rondon/PR. E-mail: fvilla2003@hotmail.com. *Autor para correspondência

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar concentrações de Si e GA₃ sobre as características de crescimento e multiplicação de orquídea sob luz natural. Plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley, oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, foram submetidas à uniformização, em meio de cultura KC modificado, durante três meses. Cada frasco conteve quatro plântulas de aproximadamente 1,0 cm de comprimento (explante) e 15 mL de meio de cultura KC, acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Os tratamentos consistiram de combinações de silicato de sódio (0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹) e GA₃ (0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹). O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar antes do processo de autoclavagem. As culturas foram mantidas em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições e 20 explantes por tratamento. Ao final de 120 dias foram avaliados número de folhas, número de brotos, número de raízes, comprimento médio de raízes e da parte aérea. O cultivo *in vitro* de *C. loddigesii* sob luz natural dependeu das concentrações de silicato de sódio e GA₃, sendo que os melhores resultados foram verificados com 0-10 mg L⁻¹ de GA₃ associada a 0-5 mg L⁻¹ de silicato de sódio.

Palavras-chave: *Cattleya loddigesii*, regulador de crescimento, orchidaceae.

ABSTRACT

Concentrations of silicon and GA₃ in *in vitro* propagation of orchids under natural light

This study aimed to evaluate concentrations of silicon (Si) and giberelic acid (GA₃) in the characteristics of growth and multiplication of orchids under natural light. Seedlings of *Cattleya loddigesii*, grown from seeds produced by self-fertilization and germinated *in vitro*, were submitted to uniformization in modified KC culture medium during three months. Each bottle contained four plants of approximately 1.0 cm (explant) and 15mL of culture medium KC plus 2 g L⁻¹ of activated charcoal. Treatments consisted of combinations of sodium silicate (0, 5, 10 and 15 mg L⁻¹) and GA₃ (0, 5, 10 and 15 mg L⁻¹). The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 ± 0.1 and made solid with 5 g L⁻¹ of agar before the sterilization process. The cultures were maintained in a greenhouse. The experimental design was completely randomized, with 5 replicates and 20 explants each treatment. After 120 days, we evaluated the number of leaves, number of sprouts, number of roots, and average length of roots and shoots. The cultivation *in vitro* of *Cattleya loddigesii* under natural light depended on the concentrations of sodium silicate and GA₃, with the best results obtained with 0-10 mg L⁻¹ of GA₃, associated with 0-5 mg L⁻¹ of sodium silicate.

Keywords: *Cattleya loddigesii*, plant growth regulator, orchidaceae.

SAP 5700

DOI: 10.18188/1983-1471/sap.v12n4p286-292

Data do envio: 19/10/2011

Data do aceite: 08/05/2012

Scientia Agraria Paranaensis - SAP
Mal. Cdo. Rondon, v.12, n.4, out./dez., p.286-292, 2013

INTRODUÇÃO

O Brasil detém um grande banco de germoplasma de orquídeas, tornando-se também responsável pela sua preservação (SUZUKI et al., 2009). O elevado número de espécies e híbridos tropicais possibilita variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo mundo. O gênero *Cattleya* ocorre naturalmente em nosso país, muito popular e procurado por orquidófilos e apreciadores, atingindo altos preços no mercado interno e externo (SILVA et al., 2009; CORDEIRO et al., 2011).

A propagação das orquídeas pode ocorrer tanto por meio de sementes como vegetativamente, sendo que nesta última utiliza-se a cultura de tecidos, onde se obtém uma grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo. Esta técnica tem sido utilizada, entre outras, para estudos de micropropagação e nutrição (ARDITTI & ERNST, 1993).

Em escala comercial, a micropropagação já é realidade em diversas áreas do mundo. No Brasil, a principal limitação para o maior acesso dos produtores a essas mudas é o elevado custo deste tipo de material propagativo, que é muito superior ao das mudas convencionais. Sabe-se que um dos fatores que elevam os custos de produção de mudas micropropagadas é o gasto com energia elétrica em salas de crescimento. Uma alternativa para esse fator seria o cultivo de plântulas *in vitro* em ambiente de luz natural (BRAGA et al., 2009).

Dentre as giberelinas, o GA₃ apresenta-se como um regulador de crescimento utilizado no alongamento das partes aéreas e de brotos, apresentando diversos efeitos que variam de acordo com a espécie estudada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Em orquídeas, a giberelina é comumente utilizada no meio visando estimular o desenvolvimento do embrião, e também na indução do florescimento, mediante pulverização (CHEN et al., 1994). Em plantas intactas de *Catsetum fimbriatum* Lindl. & Paxt. (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*, sob 16 horas de luz, o GA₃ não promoveu aumento dos pseudobulbos (SUZUKI et al., 2004).

O silício é um elemento químico envolvido em funções relacionadas com a transpiração, capaz de se concentrar na epiderme das folhas formando uma barreira mecânica à invasão de fungos no interior das células, e isto é atribuído principalmente, ao depósito na parede celular na forma de sílica amorfa. A acumulação de sílica nos órgãos de transpiração, por sua vez, provoca a formação de uma dupla camada de sílica cuticular, a qual, pela redução da transpiração, faz com que a exigência de água pelas plantas seja menor (MALAVOLTA, 2006). A sílica solúvel, forma encontrada do Si no solo, tem sido pouco estudada, pois este elemento não é considerado essencial às plantas. Porém, existem alguns trabalhos em campo, principalmente para grandes culturas, como arroz, café e soja, demonstrando o efeito benéfico da sua utilização. No solo o íon Si, em solução, pode combinar-se com o alumínio que é tóxico (RESENDE et al., 2009).

Acredita-se que o Si possa interferir na arquitetura das plantas, redução da transpiração e aumento da resistência mecânica das células, favorecendo assim a fotossíntese e proporcionando folhas mais eretas, melhorando sua arquitetura (EPSTEIN, 1999). Poucos estudos *in vitro* com este elemento relacionado às orquídeas têm sido realizados (SOARES et al., 2011). A falta de informações sobre o uso de Si em orquídeas (*in vitro/ex vitro*) justificou o presente trabalho, que objetivou avaliar concentrações de silício (Si) e ácido giberélico (GA₃) sobre características de crescimento e multiplicação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *Cattleya loddigesii*, oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, foram submetidas à uniformização, em meio de cultura Knudson C (KC) (KNUDSON, 1946), durante três meses. Após este período, cada frasco contendo quatro plântulas de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e 15 mL de meio KC; foi acrescido 2 g L⁻¹ de carvão ativado, concentrações de silicato de sódio (0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹) e GA₃ (0, 5, 10 e 15 mg L⁻¹), em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar antes do processo de autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em casa de vegetação apresentando os seguintes

parâmetros ambientais: temperatura média de 28 °C e nível de irradiância média 99,43 W.m⁻¹ aferidas no período de março a junho de 2008, sendo os frascos fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico do tipo parafilme. Os frascos foram colocados diretamente sobre as bancadas, sem proteção adicional de sombrite.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições e 20 plântulas por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 120 dias após a inoculação, analisando os seguintes parâmetros: número de folhas, número de brotos, número de raízes, comprimento médio de raízes e da parte aérea. Os dados quantitativos foram comparados por meio de regressão polinomial, empregando-se o Software Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se o teste F ao nível de 5% de probabilidade, verificou-se interação significativa somente para número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea de plântulas de *Cattleya loddigesii* (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento da parte aérea (CPA) e massa fresca da parte aérea (MFPA) de plântulas de *Cattleya loddigesii*. UFLA, Lavras/MG. 2011.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios					
		NF	NR	NB	CMR	CPA	MFPA
GA ₃	3	3,800 ^{n.s.}	5,394*	0,203 ^{n.s.}	3,629*	0,478 ^{n.s.}	0,031 ^{n.s.}
Si	3	8,016 ^{n.s.}	7,851*	0,161 ^{n.s.}	0,723 ^{n.s.}	0,195 ^{n.s.}	0,017 ^{n.s.}
GA ₃ x Si	9	2,933*	1,539 ^{n.s.}	0,354 ^{n.s.}	0,657 ^{n.s.}	0,232*	0,013*
Erro	48	1,067	0,965	0,172	0,487	0,089 ^{n.s.}	0,006 ^{n.s.}
Total	63						
CV (%)		19,13	20,95	61,56	22,40	13,86	29,57

Verifica-se na Figura 1A interação significativa para número de folhas em meio de cultura na ausência de silicato de sódio e na adição de 5 mg L⁻¹ desta solução. Pode-se inferir que, maior número de folhas (6,4) foi observado com 10 mg L⁻¹ de GA₃ e 5 mg L⁻¹ de silicato. Porém, se o objetivo do trabalho for reduzir custos, pode-se utilizar o meio Knudson C sem a adição de silicato e GA₃, para uma maior produção de folhas de *Cattleya loddigesii*. Zhou (1995) estudando o crescimento *in vitro* de *Phalaenopsis*, verificou um aumento na área foliar dessa orquídea com a adição de 1-10 mg L⁻¹ de silicato de cálcio em meio de cultura VW modificado.

Verificou-se decréscimo linear no número de folhas na ausência de silicato no meio de cultivo. O meio Knudson C possui altas concentrações de potássio e baixas de sódio em sua formulação. Pode-se inferir com isso que o acréscimo de outras fontes de sódio tenha aumentado o número de folhas de plântulas de orquídea. Pessoa (2011) e Rodrigues (2006) também verificaram que a relação folha/haste de gerbera e crisântemo, respectivamente, apresentou efeito linear decrescente para as concentrações de Si, em solução de fertirrigação.

Os benefícios do silício (Si) conferidos às plantas são devidos a sua contribuição para a estruturação da parede celular de raízes e folhas (MALAVOLTA, 2006). Portanto, este elemento não tem papel metabólico definido nas plantas e sua ação, segundo o mesmo autor, provoca efeitos indiretos, os quais, no conjunto contribuem para uma maior produtividade. Todo nutriente em excesso, como nesse caso o Si, provoca um desbalanço nutricional no sistema, ou seja, na plântula de orquídea e no meio de cultura.

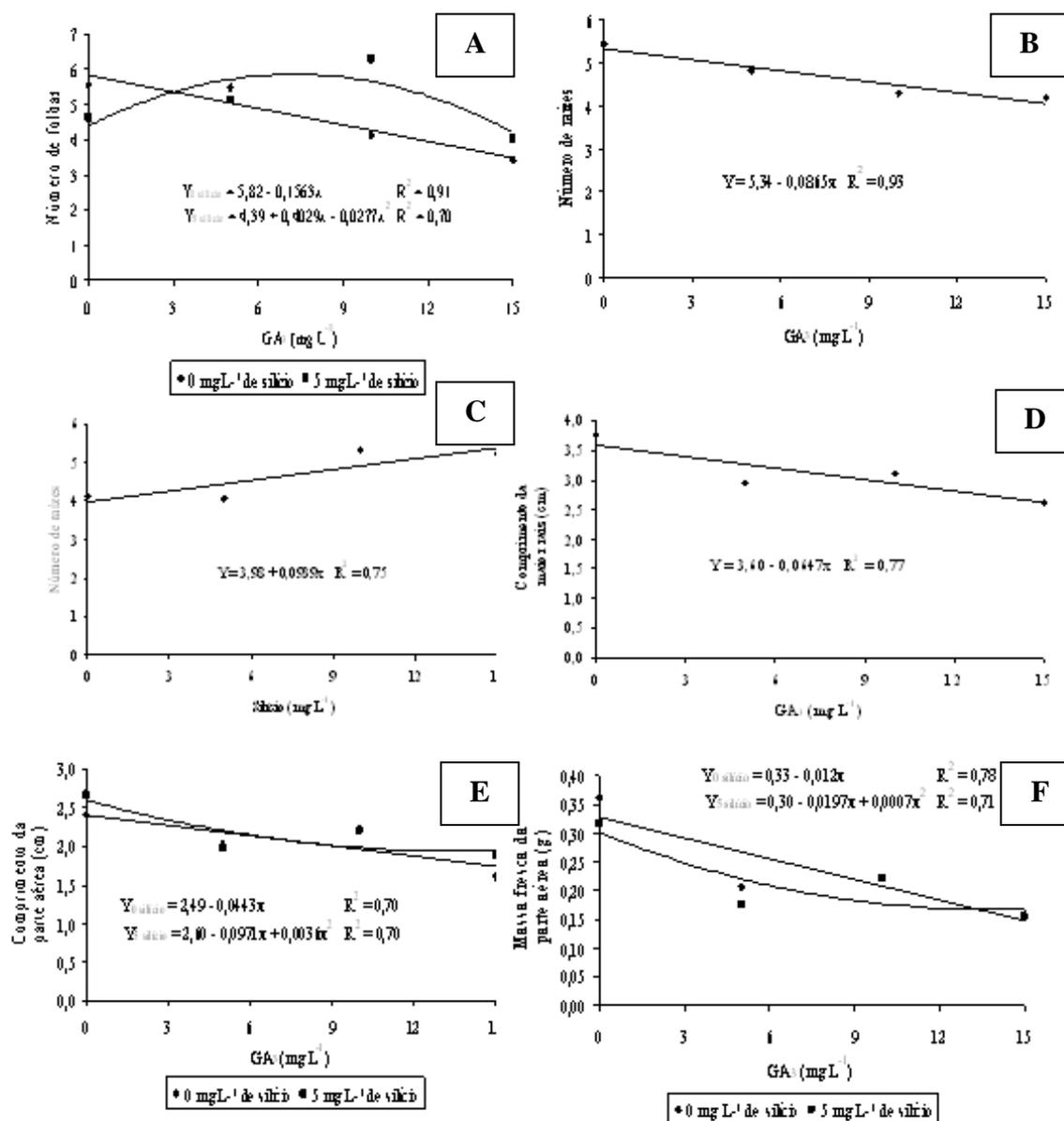


FIGURA 1 - A- Número de folhas adicionado de concentrações de GA₃ e silicato de sódio; B- Número de raízes em meio de cultura Knudson C, adicionado de concentrações de GA₃; C- Número de raízes em meio de cultura Knudson C, adicionado de concentrações de silicato de sódio; D- Comprimento da maior raiz adicionado de concentrações de GA₃; E- Comprimento da parte aérea adicionado de concentrações de GA₃ e silicato de sódio; F- Massa fresca da parte aérea de *Cattleya loddigesii* em meio de cultura Knudson C, adicionado de concentrações de GA₃ e silício. UFLA, Lavras, 2011.

O número de brotos não apresentou significância para os fatores estudados, nem houve interação entre eles. Dessa forma, para a variável em questão não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1). O ácido giberélico, em meio de cultura, normalmente diminui ou impede a formação de brotações ou embriões somáticos (PASQUAL, 2001). Além dos reguladores de crescimento, a luz influencia a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Kodyn & Zapata-Arias (1998) obtiveram maior número de brotações de bananeira em casa de vegetação sob luz natural e em sala de crescimento recebendo luz natural através de uma janela, do que sob o cultivo convencional em sala de crescimento com iluminação artificial.

Houve formação de raízes em todos os tratamentos que continham apenas o ácido giberélico (GA₃) ou o silicato separadamente (Figuras 1B e 2C). Maior número de raízes foi obtido na ausência de GA₃, verificando decréscimo de forma linear no sistema radicular formado até a concentração mais alta do fitoregulador, corroborando com Araujo et al. (2009), que estudando plântulas de *Cattleya loddigesii*, observou que o GA₃ também proporcionou um efeito inibitório no número de raízes.

Maior número de raízes (5,3) foi obtido com a associação de 10 mg L⁻¹ de silicato de sódio, verificando decréscimo de forma linear no número de raízes formadas até a concentração mais alta de silicato de sódio.

Silva (2007) obteve maior número de raízes em explantes de gérbera *in vitro*, cultivados em 50% MS adicionado de 1,0 g L⁻¹ de silicato de cálcio. O efeito ora inibitório, ora estimulatório do GA₃ e do silicato de sódio na formação do sistema radicular em diferentes plantas pode estar associado à própria concentração, bem como a absorção dos reguladores de crescimento pelo substrato (GEORGE, 2008).

Quando se aumenta a quantidade de raízes formadas *in vitro*, aumenta-se também a área de contato raiz/substrato, refletindo em maior absorção dos nutrientes. Desta forma, o sódio ou silício presente no silicato de sódio contribuíram no aumento do número de raízes. Kanashiro (2005) também observou em bromélias (*Aechmea blanchetiana*) uma maior absorção de nutrientes em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado, ocasionando um aumento no seu sistema radicular.

Kodyn & Zapata-Arias (1998), trabalhando com bananeira, observaram que as raízes formadas em ambiente de luz natural eram mais fortes e vigorosas do que as formadas em sala de crescimento, sob condições de luz natural.

Na Figura 1D observa-se um decréscimo no comprimento médio das raízes da orquídea estudada, com aumento nas concentrações do GA₃. Evidencia-se assim que, para promover o comprimento médio do sistema radicular, a adição de GA₃ no meio Knudson é desnecessária, o que torna o processo ainda mais econômico.

Verificou-se interação significativa no comprimento da parte aérea de *Cattleya loddigesii* tanto na ausência quanto na adição de 5 mg L⁻¹ de silicato de sódio ao meio de cultura (Figura 1E). Com aumento nas concentrações de GA₃, observou-se um decréscimo de forma quadrática no comprimento das plantas corroborando trabalho com orquídeas *in vitro* de Rezende et al. (2009).

Rocha et al. (2007) e Costa et al. (2009) observaram que maiores comprimentos da parte aérea dos explantes de bananeira 'Prata Anã' foram obtidos sob luz natural, com média de 11,80 cm. Maior crescimento desses brotos pode ser resultado do processo de estiolamento induzido pela menor luminosidade em sala de crescimento, quando comparada à casa de vegetação ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos, assim como no presente trabalho que foi obtido maior comprimento de parte aérea em luz natural sem a adição de GA₃ ou silicato.

Comportamento semelhante ao comprimento da parte aérea observou-se com a variável massa fresca (Figura 1F), onde resultados significativos deram-se na ausência do silicato de sódio e com a adição de 5 mg L⁻¹. Esses resultados concordam com Soares et al. (2008), que trabalhando com híbrido de orquídea *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* aço, obtiveram maior massa seca na ausência de silicato de sódio, provavelmente devido a toxidez do sódio no metabolismo das plantas.

O crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* dependem do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para a perfeita interação dos componentes essenciais como fonte de carbono e nutrientes minerais e reguladores de crescimento. Devido à falta de informações sobre a influência de fontes de silício na micropropagação de plântulas, principalmente de orquídeas, torna-se necessário à realização de trabalhos futuros, a fim de elucidar a real função do silício na estrutura da plântula.

Mesmo a luz sendo um fator importante na propagação de plantas em geral, são escassos os trabalhos sobre o efeito da intensidade de luz natural no crescimento *in vitro* de plantas. Os resultados obtidos neste estudo são considerados importantes, uma vez que as plântulas micropropagadas responderam bem aos tratamentos com luz natural, sendo possível aplicar essa técnica a fim de reduzir os custos de produção *in vitro*, levando ao mercado mudas micropropagadas de qualidade acessíveis ao consumidor.

CONCLUSÃO

Melhores resultados na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sob luz natural foram verificados com 0-10 mg L⁻¹ de GA₃ associados a 0-5 mg L⁻¹ de silicato de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.G. et al. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.5, p.542-546, 2009.

ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1993. 682 p.

BRAGA, F.T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.502-508, 2009.

CHEN, W.E. et al. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.2, p.391-395, 1994.

CORDEIRO, G.M. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley x (*Cattleya dupreana* x *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meios de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v.18, n.1, p.22-28, 2011.

COSTA, F.H.S. et al. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.641-664, 1999.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, 2011.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht : Springer, 2008. v.1, p.1-28.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al., eds. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p.183-260.

KANASHIRO, S. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith *in vitro*. 2005. 187p. Tese de Doutorado em Fitotecnia, ESALQ, Piracicaba.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.14, p.214-217, 1946.

- KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.55, p.141-145, 1998.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo. Ceres. 2006. 638 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v.15, p.473-479, 1962.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Meios de cultura. Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.
- PESSOA, C.O. **Cálcio e silício via foliar na qualidade de gérbera de corte**. 2011. 89p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.
- RESENDE, A. et al. Influência do hipoclorito de sódio como fungicida na absorção de cálcio e silício pela soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.8, n.1-2, p.25-38, 2009.
- REZENDE, J.C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. **Agrarian**, v.2, n.3, p.99-114, 2009.
- ROCHA, H.S. et al. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata Anã' (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, n.1, p.10-16, 2007.
- RODRIGUES, T.M. **Produção de crisântemo cultivado em diferentes substratos fertirrigados com fósforo, potássio e silício**. 2006. 84p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, D.P.C. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de gérbera**. 2007. 84p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, E.F. et al. Meio de cultura Knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.4, p.267-274, 2009.
- SOARES, J.D.R. et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.
- SOARES, J.D.R. et al. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.626-629, 2008.
- SUZUKI, R.M. et al. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v.36, p.657-666, 2009.
- SUZUKI, R. M. et al. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, n.2, p. 929-935, 2004.
- ZHOU, T.S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v.75, p.605-607, 1995.