

Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (*Orchidaceae*), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos

Behavior of Laelia tenebrosa (Orchidaceae) seedlings in vitro inoculated in different substrates

Gustavo Sessa Fialho¹; Julio César DoVale¹; Fabricio Moreira Sobreira¹; Edilson Romais Schmidt²

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe frente a diferentes substratos umedecidos com solução nutritiva. Os tratamentos foram: T1 (testemunha) – Solução nutritiva solidificada com 6 g.L⁻¹ de agar; T2 – Vermiculita; T3 - fibra rizomatosa moída de *Pteridium aquilinum* Kuhn. Para os tratamentos T2 e T3 utilizou-se 1L de solução nutritiva para umedecer 300 g dos referidos substratos. O experimento foi conduzido no laboratório de biotecnologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo onde plântulas previamente germinadas *in vitro* foram inoculadas em frascos com capacidade de 250 cm³ contendo para T1 - 50 mL por frasco e para T2 e T3 – 15g por frasco dos referidos substratos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições de quatro plantas cada. Após 180 dias avaliou-se a altura das plântulas, o número de folhas e o peso da matéria fresca. Para altura das plântulas e número de folhas não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos. Contudo, quando avaliou-se peso da matéria fresca T1 mostrou-se superior a T3 por incrementar em média 58,5 mg no peso da matéria fresca por plântula.

Palavras-chave: *Laelia tenebrosa* Rolfe, *Orchidaceae*, desenvolvimento *in vitro*.

ABSTRACT

This research studied in vitro development of Laelia tenebrosa Rolfe seedlings under different substrates watered with a nutrient solution. The nutrient solution was the same for all treatments: MS liquid medium + 2 mg of BAP per liter + 0.1 mg of AIA and pH adjusted to 5.8 ± 1.0 before autoclaving at 121 °C, 1 atm. for 20 minutes. The evaluated treatments were: T1 - nutrient solution + 6 g of agar per liter; T2 - nutrient solution + vermiculite and T3 - nutrient solution + rhizome fiber of Pteridium aquilinum Kuhn. The experiment was conducted in a completely randomized design, with 4 seedlings per replicate. When the seedlings reached an average height of 1 cm they were sub-cultivated in a 250 cm³ bottle containing: T1 - 50 mL nutrient solution + 6 g agar per liter; T2 - 15 g nutrient solution + vermiculite and T3 - 15 g nutrient solution + rhizome fiber of Pteridium aquilinum Kuhn. Each gram of substrate of T2 and T3 was watered with 5 ml of nutrient solution. After 180 days of seedling sub-cultivation the following parameters were evaluated: height of aerial part, leaf number and total fresh mass. There was no significant difference between the treatment means for aerial height or leaf number. However, when weight of the fresh mass was evaluated, T1 was superior to T3; it showed an increase of 58.5 mg on the average in the weight of the fresh mass of seedlings.

Key words: *Laelia tenebrosa* Rolfe, *Orchidaceae*, *in vitro* development.

Introdução

As orquídeas são plantas muito almejadas por apresentarem inflorescências grandes, volumosas e coloridas. No planeta existem cerca de 35.000 espécies distribuídas em seis tribos, 80 subtribos

e 750 gêneros (Heywood, 1993; Blossfeld, 1999). Atualmente algumas destas espécies vêm sendo ameaçadas de extinção quer seja por práticas extrativistas ou pela devastação de seus habitats naturais (Colombo *et al.*, 2004). Neste contexto, enquadra-se a *Laelia tenebrosa* Rolfe, que vegeta

¹ Eng. Agrº., doutorando, Deptº Fitotecnia/Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-Minas Gerais - Brasil, CEP: 36570-000, gsfialho@hotmail.com

² Prof. Adjunto, Deptº de Ciências da Saúde, Biológicas e Agrárias, CEUNES/UFES, São Mateus-ES, Brasil.

principalmente nos remanescentes de mata atlântica do Espírito Santo e Rio de Janeiro, Estados brasileiros (Ruschi, 1986). A referida espécie encontra-se na lista de plantas ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Segundo Faria *et al.* (2006), As orquídeas apresentam desenvolvimento vegetativo vagaroso, visto que a propagação por divisão de touceira leva, no mínimo, dois anos, o que torna lenta e onerosa a multiplicação em grandes quantidades para a comercialização de mudas. A propagação de orquídeas por sementes também é demorada e das milhões de sementes produzidas em uma cápsula, somente 5% germinam. A cultura de células e tecidos vegetais tem contribuído grandemente para o desenvolvimento da orquidocultura, onde o cultivo em meio nutritivo, utilizando técnicas especiais, têm permitido acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando o processo de multiplicação de orquídeas viável (Stancato e Faria, 1996).

O ágar é o agente gelificante mais utilizado na propagação *in vitro*, pela sua grande eficiência como promotor de condições ideais de suporte para as plântulas (Waes, 1987; Stancato e Faria, 1996; Faria *et al.*, 2002). Todavia, ele também é o componente mais oneroso do meio de cultura. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), há uma tendência mundial de se buscarem sistemas utilizando meio líquido, em virtude da redução do custo pela eliminação do ágar e da maior agilidade na preparação do meio de cultura.

Desta forma, para a espécie supracitada, estudos referentes à sua multiplicação e desempenho *in vitro* frente a estruturadores físicos do meio de cultura que sejam mais baratos que o ágar, revestem-se de grande importância visto que podem corroborar com a propagação destas plantas em escala que permita sua reintrodução na natureza a custos reduzidos.

O presente trabalho objetivou estudar a influência de diferentes substratos no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Laelia tenebrosa*, bem como analisar o seu comportamento, de modo a contribuir com informações relevantes que possam auxiliar na luta contra seu futuro desaparecimento.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de biotecnologia do Centro de Ciências Agrárias

da Universidade federal do Espírito Santo (CCA-UFES), localizado no município de Alegre/ES, latitude 20°45' Sul, longitude 41°48' Oeste e altitude de 150 m.

Como base comum para a confecção do meio de cultura, utilizou-se solução nutritiva de sais MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementada com 2 mg.L⁻¹ de BAP, 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e pH ajustado para 5,8 ± 1,0 antes da autoclavagem a 121°C, 1 atm por 20 minutos. Os tratamentos foram: T1 (testemunha) – Solução nutritiva solidificada com 6 g.L⁻¹ de agar; T2 – Vermiculita; T3 - fibra rizomatosa moída de *Pteridium aquilinum* Kuhn. Tanto para os tratamentos T2 e T3 utilizou-se 1 L de solução nutritiva para umedecer 300 g dos referidos substratos. Plântulas com aproximadamente 1,5 ± 0,5 cm de comprimento, oriundas de germinação *in vitro*, foram inoculadas em frascos com capacidade de 250 cm³ contendo para T1 - 50 mL por frasco e para T2 e T3 - 15g por frasco dos referidos substratos. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar os frascos foram transferidos para sala de cultivo a 25 ± 2 °C, intensidade luminosa de 35 µM.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de quatro plântulas cada. Decorridos 180 dias, como variáveis para a análise do desenvolvimento, avaliou-se a altura das plântulas, o número de folhas e o peso da matéria fresca. Utilizando-se para tal, régua milimetrada e balança analítica de precisão (0,0001).

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o aplicativo computacional em genética e estatística, denominado programa GENES (Cruz, 2006).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para as variáveis analisadas encontram-se abaixo divulgados na Tabela 1.

De modo geral, a espécie *Laelia tenebrosa* Rolfe mostrou excelente performance *in vitro*, com boa taxa de crescimento e produção de folhas.

Para as variáveis altura das plântulas e número de folhas não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos (Tabela 1), indicando que tanto a vermiculita quanto a fibra rizomatosa de *Pteridium aquilinum* Kuhn apresentaram efeito semelhante ao do ágar sobre as referidas variáveis. Todavia, quando avaliamos o peso da matéria fresca

Tabela 1. Altura das plântulas, número de folhas e peso da matéria fresca medidas em *Laelia tenebrosa* Rolfe aos 180 dias a pós a inoculação *in vitro* sob diferentes substratos, CCA-UFES, Alegre- ES

Tratamentos	Altura das plântulas	Numero de folhas	Matéria fresca
T1 – Solução nutritiva solidificada com 6 (g.L ⁻¹) de ágar	1,7125 a	4,75 a	0,0824 a
T2 – Vermiculita	1,0375 a	4,50 a	0,0549 ab
T3 - fibra de Pteridium aquilinum Kuhn	0,9438 a	4,26 a	0,0239 b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

das plântulas somente diferiram significativamente entre si as médias dos tratamentos T1 (solução nutritiva solidificada com 6 g.L⁻¹ de ágar) e T3 (fibra rizomatosa de *Pteridium aquilinum* Kuhn), onde o efeito de T1 sobre a variável em questão igualou-se ao de T2 (vermiculita) e mostrou-se superior a T3 por incrementar em média 58,5 mg no peso da matéria fresca por plântula (Tabela 1). O que reafirma a explanação de Grattapaglia e Machado (1998): “substratos inertes, como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano, embebidas em meio líquido, podem ser alternativas de menor custo que o Agar”.

Conclusão

- Os diferentes substratos, não influenciaram no número de folhas e na altura das plântulas testadas.
- Para o peso da matéria fresca o melhor tratamento foi T1 – Solução nutritiva solidificada com 6 g.L⁻¹ de ágar e T2 (15g por frasco de vermiculita umedecida com 50 ml de solução nutritiva).
- A vermiculita pode ser utilizada em substituição ao ágar como agente estruturador de meio de cultura.

Literatura Citada

- Blossfeld, A.
1999 *Orquidologia, Orquidofilia e Orquicultura*. Jaboticabal: FUNESP, 89 p.
- Colombo, L. A.; Faria, R. T.; Carvalho, J. F. R. P.; Assis, A. M.; Fonseca, I. C. B.
2004 Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum (UEM)*, Maringá, 26 (2): 253-258.
- Cruz, C. D. 2006. *Programa GENES: estatística experimental e matrizes*. Editora UFV: Viçosa, 480 p.
- Faria, R. T.; Dalio, R. J. D.; Unemoto, L. K. ; Silva, G. L.
2006 Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum (UEM)*, Maringá, 28 (1): 71-74.
- Faria, R. T.; Santiago, D. C.; Saridakis, D. P.; Albino, U. B.; Araújo, R.
2002 Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. Crop breeding and applied biotechnology, Viçosa, 2 (3): 489-492.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A.
1998 Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI, pp. 183-260.
- Heywood, V.H. 1993. *Flowering plants of the world*. London: B.T. Batsford, 335 p.
- Murashige, T.; Skoog, F.
1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, 15 (3): 473-479.
- Ruschi, A.
1986 *Orquídeas do Espírito Santo*. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 278 p.
- Stancato, G.C.; Faria, R.T.
1996 *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: effects of macro and microelements. *Lindleyana*, West Palm Beach, 11 (1): 41-43.
- Waes, J.
1987 Effects of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 131-138.

