

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

ALINNE DE OLIVEIRA ANDRADE

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MS E DE DUAS
CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Cattleya nobilior (Rchb.f).**

**DOURADOS-MS
2013**

ALINNE DE OLIVEIRA ANDRADE

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MS E DE DUAS
CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Cattleya nobilior (Rchb.f).**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado para obtenção do grau de
Biotecnólogo no curso de biotecnologia
da Universidade Federal da Grande
Dourados.

Orientador: Yara Brito Chaim Jardim
Rosa.

**DOURADOS-MS
2013**

ALINNE DE OLIVEIRA ANDRADE

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MS E DE DUAS
CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Cattleya nobilior (Rchb.f).**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado para obtenção do grau de
Biotecnólogo no curso de biotecnologia
da Universidade Federal da Grande
Dourados.

Orientador: Yara Brito Chaim Jardim
Rosa.

Dourados, de de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Yara B. C. J. Rosa (Orientadora)

Msc. Jackeline Schultz Soares

Msc. José Carlos Sorgato

"Bendito sejas, ó Senhor, Deus de Israel, nosso pai, de eternidade a eternidade. Teus, ó Senhor, são a grandeza, o poder, a glória, a majestade e o esplendor, pois tudo o que há nos céus e na terra é teu.

Teu, ó Senhor, é o reino tu estás acima de tudo. A riqueza e a honra vêm de ti; tu dominas sobre todas as coisas. Nas tuas mãos estão a força e o poder para exaltar e dar força a todos.

Agora, nosso Deus, damos-te graças, e louvamos o teu glorioso nome. Mas quem sou eu, e quem é o meu povo para que pudéssemos contribuir tão generosamente como fizemos? Tudo vem de ti, e nós apenas te demos o que vem das tuas mãos.

1Crônicas 29:10-14

Ora, ao Rei dos séculos, imortal, invisível, ao único Deus sejam honra e glória para todo sempre. Amém.

1Timóteo 1:17

AGRADECIMENTOS

Ao Deus eterno e soberano, criador de todas as coisas, que por Sua graça e amor foi a frente de todas as situações e me deu a sabedoria necessária para que mais essa etapa fosse concluída. A Ele que é digno, todo meu louvor e gratidão.

À minha querida mãe por todo suporte emocional e financeiro que me sustentaram longe de casa durante esses 4 anos e meio de graduação e a minha família que sempre presente me animou e encorajou em minha jornada; ao noivo pelo carinho, amizade e também pela ajuda técnica neste trabalho; aos amigos que tanto me incentivaram, em especial à Shara, Bruna e Luiza, que caminharam ao meu lado do início ao fim, e me ajudaram mais do que imaginam; aos colegas de classe que sempre dispostos a repassarem informações e tirarem dúvidas, muito me ajudaram.

À minha orientadora Yara B. C. J. Rosa, pelo acolhimento e dedicação no ensino; ao corpo docente do curso de Biotecnologia da UFGD, por toda a contribuição intelectual e tempo gasto em prol do ensino.

A todos estes, sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ARTIGO.....	8
INTRODUÇÃO.....	10
MÉTODOS.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	22

RESUMO

A composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo, são fatores determinantes para o sucesso da propagação *in vitro* de plantas de orquídeas e podem influenciar a qualidade das mudas produzidas. Com o objetivo de estudar o crescimento *in vitro* de plantas de *Cattleya nobilior*, foram avaliados 25 diferentes concentrações salinas do meio de cultura MS, variando de 0 a 100 % (com intervalos médios de 4%), sob duas condições de luminosidade: luz vermelha (V) e luz vermelha e branca (VB). Foram inoculadas plantas de aproximadamente 1cm de comprimento e o meio de cultura foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1. Decorridos 120 dias do transplante, as plantas foram avaliadas quanto a porcentagem de sobrevivência, massa fresca, altura e diâmetro da touceira, comprimento da maior raiz da touceira, número de perfilhos, de raiz e de folhas da touceira. Foi verificado efeito conjunto ($p < 0,01$) das condições de luminosidade e da concentração salina do meio MS, sobre todas as variáveis estudadas. Também foi observado efeito isolado ($p < 0,01$) da concentração salina do meio MS sobre as variáveis analisadas, entretanto as condições de luminosidade, isoladamente, não interferiram ($p > 0,05$) nos resultados desse trabalho. A concentração de sais do meio MS variando de 60 a 75% propiciou incremento em todas as variáveis estudadas independentemente da condição de luminosidade. A utilização de luminosidade de 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ propiciada por uma lâmpada fluorescente branca associada a uma lâmpada fluorescente vermelha é eficiente para o crescimento *in vitro* de *C. nobilior* minimizando os custos de produção.

ARTIGO

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MS E DE DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya nobilior*(Rchb.f).

Alinne de Oliveira Andrade¹; Yara B. C. Jardim Rosa²; Shara Rodrigues da Silva¹; Nilda T. Kobayashi Hoffmann³

¹ Acadêmica de biotecnologia/UFGD. ² Professora Dra. UFGD/FCA. ³ Técnica de laboratório FCA.

RESUMO

A composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo, são fatores determinantes para o sucesso da propagação *in vitro* de plantas de orquídeas e podem influenciar a qualidade das mudas produzidas. Com o objetivo de estudar o crescimento *in vitro* de plantas de *Cattleya nobilior*, foram avaliados 25 diferentes concentrações salinas do meio de cultura MS, variando de 0 a 100 % (com intervalos médios de 4%), sob duas condições de luminosidade: luz vermelha (V) e luz vermelha e branca (VB). Foram inoculadas plantas de aproximadamente 1cm de comprimento e o meio de cultura foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1. Decorridos 120 dias do transplante, as plantas foram avaliadas quanto a porcentagem de sobrevivência, massa fresca, altura e diâmetro da touceira, comprimento da maior raiz da touceira, número de perfilhos, de raiz e de folhas da touceira. Foi verificado efeito conjunto (p<0,01) das condições de luminosidade e da concentração salina do meio MS, sobre todas as variáveis estudadas. Também foi observado efeito isolado (p<0,01) da concentração salina do meio MS sobre as variáveis analisadas, entretanto as condições de luminosidade, isoladamente, não interferiram (p>0,05) nos resultados desse trabalho. A concentração de sais do meio MS variando de 60 a 75% propiciou incremento em todas as variáveis estudadas independentemente da condição de luminosidade. A utilização de luminosidade de 15 µmol m⁻² s⁻¹ propiciada por uma lâmpada fluorescente branca associada a uma lâmpada fluorescente vermelha é eficiente para o crescimento *in vitro* de *C. nobilior* minimizando os custos de produção.

PALAVRAS-CHAVES: Orchidaceae, floricultura, condições de cultivo.

ABSTRACT

The composition of the culture medium and the culture conditions are crucial for the success of *in vitro* propagation of orchids and plants can influence the quality of the seedlings. In order to study the *in vitro* growth of plants of *Cattleya nobilior* were evaluated 25 different salt concentrations in the culture medium, ranging from 0 to 100% (with intervals of 4%) under two light conditions: red light (V) and red and white light (VB). Plants were inoculated with approximately 1 cm long and the culture medium was supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 5.5 g L⁻¹ bacteriological agar and the pH was adjusted to 5.8 ± 0.1. After 120 days of transplantation, the plants were evaluated for survival percentage, fresh weight, height and diameter of the clump, length of highest root of the clump, number of tillers, root and leaves of the clump. Was observed joint effect (p <0.01) on the lighting conditions and the salt concentration of MS medium on all variables. Isolated effect was also observed (p <0.01) of the salt concentration of MS medium on the variables analyzed, however the light conditions, alone, did not affect (p > 0.05) in the results of this work. The salt concentration of MS medium ranging from 60 to 75% increase provided in all variables regardless of lighting condition. The use of light of 15 mol m⁻² s⁻¹ afforded a white fluorescent lamp associated with a red fluorescent is efficient for *in vitro* growth *C. nobilior* minimizing production costs.

Key words: Orchidaceae, *in vitro* conditions; floriculture

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae originou-se na Malásia (GARAY, 1972), possui cerca de 850 gêneros e cerca de 25.000 espécies distribuídas em quase todos os continentes (STOUTAMIRE, 1964; DRESSELER, 2005; KERBAUY, 2011) e, no Brasil, Barros et al. (2013) listam 2.440 espécies, das quais 1.630 são endêmicas do país. Caracterizam-se, por apresentar um intrincado mecanismo reprodutivo, em que a maior parte da energia disponível para este fim é direcionada à produção de flores e atração de polinizadores (McKENDRICK et al., 2000; BHADRA e HOSSAIN, 2003).

Grande tem sido o interesse comercial por Orchidaceae e as exportações brasileiras de mudas dessa família somaram US\$ 219,86 mil em 2009 (JUNQUEIRA e PEETZ, 2010) sendo os gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* e *Oncidium* os mais promissores para exportação (MATTIUZ et al., 2006; FARIA, 2012).

Cattleya nobilior Rchb.f é uma espécie de orquídea que ocorre no Brasil, exclusivamente no bioma Cerrado (BARROS et al., 2013), são epífitas, atingindo de 10 a 20 cm de altura, floresce nos meses de agosto a setembro e apresenta inflorescências que produzem geralmente de uma a três flores róseo-lilases, grandes e muito vistosas. Por todos esses motivos, a espécie é submetida à pressão de coleta voltada para a comercialização (BIANCHETTI, 2007). Entretanto *Cattleya nobilior* encontra-se na lista das espécies cujas informações são ainda deficientes, (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008), portanto qualquer iniciativa voltada para a sua conservação deve ser valorizada (BIANCHETTI, 2007), já que informações sobre sua propagação são praticamente inexistentes.

Sob condições naturais, a germinação e o desenvolvimento de plantas de orquídeas ocorrem após o estabelecimento de associações simbióticas com fungos micorrízicos (RASMUSSEN, 2002; SAHA e RAO, 2006; RASMUSSEN e RASMUSSEN, 2007; BOLDRINI et al., 2010). Entretanto, as sementes também podem germinar e se desenvolver sob condições assépticas, desde que cultivadas em meio de cultura, contendo nutrientes minerais, carboidratos e outros compostos orgânicos (JOHNSON et al., 2011).

A escolha apropriada do meio nutritivo é um dos principais fatores no sucesso da cultura assimbiótica, uma vez que a germinação e o crescimento das plantas variam de acordo com as necessidades de cada espécie (DREW, 1987). Apesar da composição e da concentração de nutrientes no meio de cultura serem fatores

determinantes para o sucesso do cultivo *in vitro*, a falta de informação das exigências nutricionais de determinada espécie induz a utilização de meios de cultivo mais elaborados que nem sempre propiciam condições assimbióticas adequadas e que muitas vezes colaboram para o aumento dos custos de produção (RODRIGUES et al., 2012).

Dentre as formulações mais utilizadas na germinação e no crescimento inicial de plantas de orquídeas estão os meios Knudson C, VW, MS ½ e MS (FARIA et al., 2012) sendo o último, segundo Rodrigues et al (2012), frequentemente utilizado nos trabalhos científicos.

A luz é outro fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento (MORINI & MULEO, 2003). As salas de crescimento para cultivo *in vitro* quase sempre utilizam lâmpadas fluorescentes brancas (400 - 600 nm) que são desprovidas de ondas na faixa do vermelho (KÄMPF, 2005). Devido à importância da luz vermelha na fotomorfogênese, alguns autores têm analisado este comprimento de onda como forma de propiciar maior crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*, pois apesar de confirmados efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade de luz nas plantas, as respostas variam de acordo com o tipo de luz utilizada e a espécie estudada (SCHUERGER et al., 1997; ANTONOPOULOU et al., 2004).

O bom desenvolvimento das plantas *in vitro* é fundamental na fase aclimação destas, tendo em vista que é necessário que elas apresentem boas condições morfofisiológicas pra serem capazes de sobreviver no ambiente externo (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995; KERBAUY 2008; TAVEIRA, 2011).

Segundo Araújo et al. (2009) plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro* sob luz vermelha, apresentaram maior alongamento da parte aérea assim como Cybularz-Urban et al. (2007) observaram o aumento do comprimento de broto para híbrido de *Cattleya*. Em contrapartida, a utilização de luz vermelha, reduziu o comprimento da maior raiz e aumentou o índice de mortalidade de *Cattleya loddigesii* durante a aclimação (GALDIANO JUNIOR et al., 2012).

Diante disso, objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito de duas condições de luminosidade e da concentração salina do meio MS, bem como a interação destas variáveis nas características morfológicas de plantas de *Cattleya nobilior* cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados – MS, durante o período de setembro de 2012 a janeiro de 2013.

Foram utilizadas como material de estudo plantas de *Cattleya nobilior*, oriundas de sementeira *in vitro* em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) e cultivadas, por 6 meses sem subcultivos, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Utilizou-se o meio de cultura MS, com concentrações de nutrientes variando de 0 a 100 % (com intervalos médios de 4%), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com KOH (1M). Foram utilizados como frascos de cultivo, recipientes de vidro transparentes com capacidade para 600 mL, providos de tampa metálica, que após receberem 60mL de um dos 25 meios nutritivos estudados, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de $1,05 \text{ kg.cm}^{-2}$ por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu quatro plantas de aproximadamente um centímetro de altura. Na sequência, os frascos foram tampados e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h produzido por duas diferentes condições de luminosidade: 1- luz fluorescente branca + luz fluorescente vermelha (GRO-LUX®) ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 2- luz fluorescente vermelha (GRO-LUX®) ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), não sendo realizados subcultivos.

Decorridos 120 dias do transplante, os frascos foram abertos, as plantas foram removidas dos meios de cultura, e avaliadas quanto a porcentagem de sobrevivência, massa fresca, altura e diâmetro da touceira, comprimento da maior raiz da touceira, número de perfilhos, de raiz e de folhas da touceira.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema de parcela subdividida, sendo alocadas nas parcelas, as duas condições de luminosidade e, nas subparcelas, os 25 meios nutritivos, com três repetições de quatro plantas cada.

Para análise estatística utilizou-se o aplicativo computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010) e as variáveis foram submetidas à análise de variância, e posteriormente as médias dos fatores qualitativos foram comparadas pelo teste t de Student, até o nível de 5%, enquanto que àquelas, referentes aos fatores quantitativos, foram ajustadas curvas de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância, bem como a significância ou não dos fatores estudados e as médias gerais das variáveis analisadas constam da Tabela 1.

Houve efeito conjunto ($p < 0,01$) das condições de luminosidade e da concentração salina do meio MS, sobre todas as variáveis estudadas. Também foi observado efeito isolado ($p < 0,01$) da concentração salina do meio MS sobre todas as variáveis analisadas, entretanto as condições de luminosidade, isoladamente, não interferiram ($p > 0,05$) nos resultados desse trabalho (Tabela 1).

Tabela 1 Resumo das análises de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB), massa fresca (MF), altura (AT) e diâmetro (DT) da touceira, comprimento da maior raiz (CR), número de perfilhos (NP), de raízes (NR) e de folhas (NF) de *Cattleya nobilior* Rchb. f..UFGD, Dourados-MS, 2012.

F.V.	G.L.	Quadrados médios			
		%SOB	MF	AT	DT
Luz	1	3,86 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,20 ^{ns}
Erro 1	4	5,26	0,06	1,82	4,41
MS	24	34,60**	0,95**	22,97**	30,18**
Luz x MS	24	6,47**	0,80**	3,23**	3,08**
Erro 2	96	1,32	0,02	0,72	1,02
CV(%)		14,01	10,34	5,46	6,21
M. geral		74%	1,27g	1,47cm	1,72cm
F.V.	G.L.	CR	NP	NR	NF
Luz	1	0,06 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,53 ^{ns}
Erro 1	4	0,19	4,54	2,14	23,04
MS	24	0,55**	18,87**	7,55**	97,49**
Luz x MS	24	0,24**	4,91**	2,47**	20,03**
Erro 2	96	0,03	1,05	0,53	3,95
CV(%)		13,60	25,45	26,06	25,74
M. geral		1,48cm	19,94	8,83	80,65

** significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F
ns não significativo

A maior porcentagem de sobrevivência de *C. nobilior* foi de 92 % sob

luminosidade branca + vermelha (VB) quando as plantas foram cultivadas em concentrações salinas do meio MS de 60%. Houve efeito das condições de luminosidade sobre a % sobrevivência apenas quando a concentração salina variou de 0 a 40% (Figura 1).

A ausência de sais nos meios nutritivos proporcionou porcentagem de sobrevivência de 43% sob luz V e de 24% sob luz VB, indicando que quando se disponibiliza apenas a fonte de carboidrato no meio assimbiótico, a sobrevivência das plantas é maior em luminosidade V. Este fato pode estar relacionado com a influência significativa da luz vermelha na fotomorfogênese (KÄMPF, 2005; KERBAUY 2008), que associada unicamente à presença do carboidrato promoveu maior sobrevivência das plantas (Figura 1).

Embora concentrações salinas do meio MS, superiores ou inferiores 60% tenham promovido decréscimos na porcentagem de sobrevivência, a utilização de 100% dos sais promoveu porcentagem de sobrevivência de 64% (V) e 63% (VB) ambas superiores a total ausência deles (Figura 1).

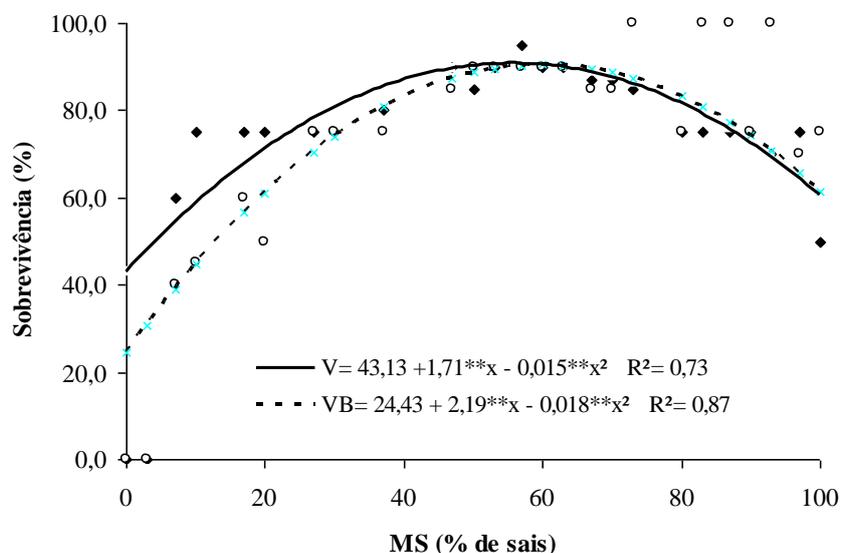


Figura 1 Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Para a variável número de perfilhos, a maior média (29) foi alcançada no tratamento contendo 66% de solução nutritiva sob luz V, no entanto, as condições de luminosidade só apresentaram diferenças estatísticas em concentrações salinas

superiores a 70%, quando a luz V foi estatisticamente mais eficaz em promover brotações que a luz VB (Figura 2).

De semelhante modo, Marks & Simpson (1999) no cultivo de *Disanthus cercidifolius*, cultivares de *Rhododendron* e *Crataegus oxyacantha*, concluíram que a luz vermelha promoveu a maior brotação. E Norton et al (1988) verificou que a luz vermelha, em comparação à luz branca, incrementou o número de brotos axilares em culturas *in vitro* de espécies ornamentais.

Resultados relativos ao número de brotações relacionado à concentração salina dos meios de cultivos variam em função da espécie em estudo. Em trabalho com café 'Catuaí', Forni & Pasqual (1996) observaram que o aumento dos níveis de sais do meio MS proporcionou maior número de brotos. Castro et al. (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de *Limonium brasiliensis*, verificou que 50% de meio MS revelou-se significativo para a variável número de brotações por explante. Sorace et al (2008), estudando *Oncidium baueri*, verificaram que as maiores médias de brotações foram alcançadas no tratamento contendo MS ½, com adição de 40 gL⁻¹ de sacarose.

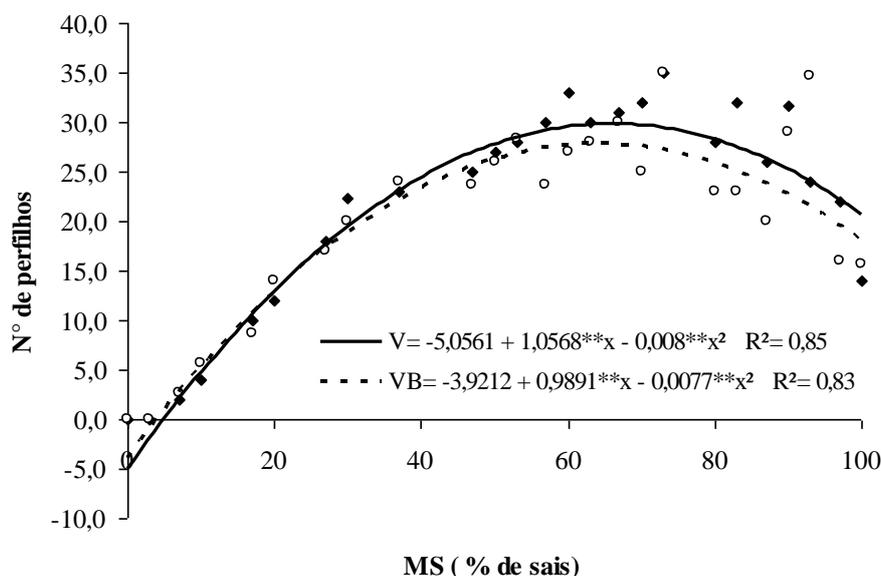


Figura 2 Número de perfílios de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Uma provável causa do maior número de brotações ser obtida em menores concentrações salinas do meio MS para algumas espécies pode estar relacionada com os teores de nitrato encontrados nesse meio. Bessalho et al. (1993) estudaram a influência da concentração de nitrato de amônio na brotação de *Stevia rebaudiana* (Bert.) *in vitro* e

constatarem que a concentração desse sal utilizado no meio MS mostrou-se tóxica e obtiveram maior indução de brotações usando 1/4 da dose de nitrato de amônio recomendado pelo meio MS.

Estes resultados comprovam respostas diferenciadas entre as espécies, contudo níveis medianos de sais do meio MS propiciam uma boa multiplicação *in vitro* de inúmeras espécies estudadas, podendo essa concentração ser indicada não só para induzir brotações como também otimizar os custos de produção (CASTRO et al., 2003).

De maneira análoga ao número de perfilhos, o maior número de folhas (126) foi observado no meio MS 67% sob luz V, havendo diferença estatística para esta variável em relação às condições de luminosidade apenas em concentrações salinas entre 30 e 80% nas quais a luz V propiciou maior número de folhas que a VB (Figura 3).

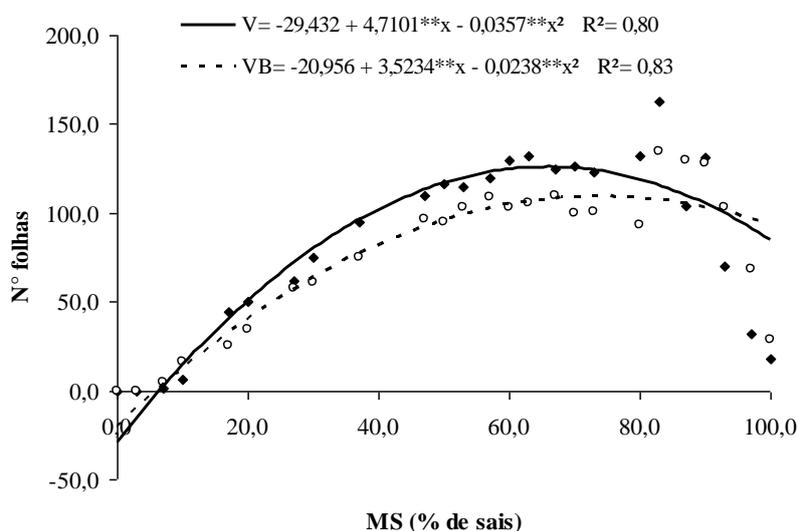


Figura 3 Número de folhas de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

O menor número de folhas obtido em menores concentrações salinas do meio MS pode estar relacionado ao fato de que tanto o crescimento quanto a morfogênese em culturas *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de N (RIBEIRO et al., 2002). O elevado número de folhas relatados em muitos trabalhos estão associados à utilização de altas concentrações de nutrientes, muitas vezes até superiores a concentração normal de MS, como foi o caso de Villa et al. (2005), em que o maior número de folhas (7,89) em amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Ébano, foi obtido em MS 150% associado a 1 mg L^{-1} BAP. Entretanto é importante ressaltar que não existe

uma regra geral para as espécies e que concentrações salinas superiores a 67% foram prejudiciais ao perfilhamento e à emissão de folhas de *C. nobilior*.

O maior número de folhas registrado em concentrações salinas variando de 30 a 80% sob V (Figura 3) deve-se, provavelmente, à característica fotomorfogênica que essa luz apresenta (KÄMPF, 2005; KERBAUY 2008). Erig & Schuch (2005), trabalhando com *Rubus idaeus L.* também registraram maior número de folhas em cultivos com luz vermelha com 4,4 µM de BAP adicionado ao meio de cultura. Entretanto, Morini & Muleo (2003) concluíram que a exposição contínua ao escuro e a faixa de luz do vermelho-longo promovem modificações na morfologia da cultura, entre as quais, menor expansão das folhas. Essa divergência deve-se ao fato de que a qualidade de luz pode variar com a espécie de planta, o estágio de crescimento, as condições ambientais, a composição do meio de cultura e a ventilação (ERIG & SCHUCH, 2005)

A maior altura das touceiras (2,0 cm) foi obtida com a utilização de 76% dos sais do meio MS e cultivo sob luz V só havendo efeito das condições de luminosidade sobre essa variável em concentrações salinas superiores a 80% onde plantas cultivadas sob luz V apresentaram altura da touceira estatisticamente maiores que aquelas cultivadas sob luz VB. Embora concentrações salinas do meio MS, superiores ou inferiores a 76% (V), tenham reduzido a altura das touceiras a utilização de 100% dos sais promoveu touceiras mais altas que a total ausência deles (Figura 4).

Relatos indicando como ideal a concentração salina do meio MS inferiores a 100% foram feitos por Sorace et al (2008), que estudando os meios de cultivo MS e MS^{1/2}, verificaram que as maiores alturas de plantas de *Oncidium baueri* foram obtidas em meio MS^{1/2}. De maneira análoga, Stancato e Faria (1996), em trabalho desenvolvido com diferentes composições de meio de cultura para a orquídea *Laelia cinnabarina*, obtiveram resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* em meio MS com metade da concentração dos macronutrientes e, Bressan et al. (1999) registraram maior desenvolvimento de *Phalaenopsis (Orchidaceae) in vitro*, no meio de cultura com 1/3 da concentração de sais do MS.

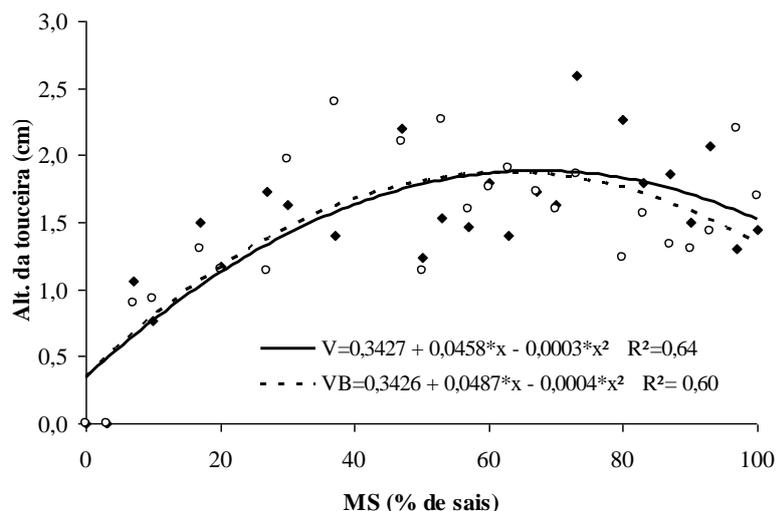


Figura 4 Altura da touceira de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Semelhante à altura das touceiras o diâmetro das mesmas só foi influenciado pelas condições de luminosidade em concentrações salinas superiores a 80% onde a luz VB foi mais eficaz em promover o aumento do diâmetro que a luz V. O maior diâmetro de touceira (1,9) foi observado com a utilização de 64% de sais do meio MS, sob luminosidade V (Figura 5) e de maneira análoga a utilização de 100% dos sais promoveu diâmetros de touceiras maiores que a total ausência deles (Figura 5).

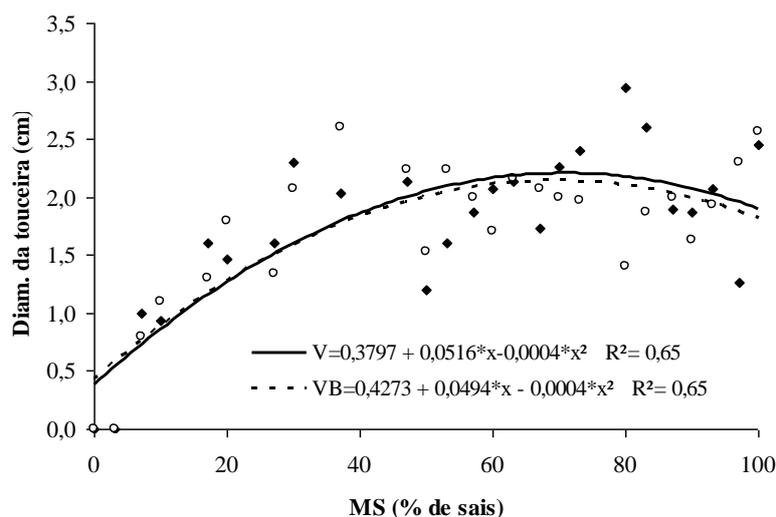


Figura 5 Diâmetro da touceira de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

A concentração de sais do meio MS variando de 60 a 75% propiciou incremento em todas as variáveis relacionadas à parte aérea da planta independentemente da condição de luminosidade utilizada podendo ser recomendada quando o objetivo é o incremento dessa porção da planta.

O maior número de raízes (22) foi obtido quando as plantas de *C. nobilior* foram cultivadas em meio MS com concentração de sais de 69% sob luz VB. As condições de luminosidade não influenciaram essa variável quando as plantas foram cultivadas com concentração salina variando de 50 a 70% (Figura 6).

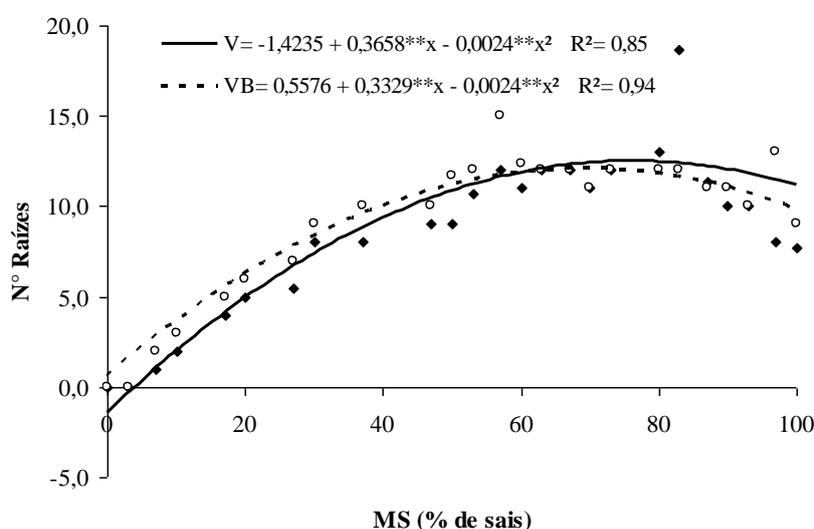


Figura 6 Número de raízes de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Até a concentração de 50%, o número de raízes em plantas cultivadas sob luz VB foi estatisticamente superior ao da luz V e, em concentrações superiores a 70% observou-se o contrário.

Concentrações salinas inferiores às máximas prescritas em diferentes meios de cultivo são relatadas por vários autores como benéficas à indução do enraizamento. Drew (1987) relatou aumento na iniciação radicular de brotos de *Caryca papaya* em meio de cultivo com menor concentração salina. Concentrações medianas de meio de cultura foram indicadas por Dantas et al. (2000) para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Caiguangue.

Erige et al. (2004) observaram que em Armeleiro cvs. MC e Adams, 75% da

concentração de meio MS é suficiente para a obtenção do enraizamento *in vitro*. Os autores também relataram que 100% da concentração de sais desfavoreceu o enraizamento da cv Adams.

Embora o fornecimento de nutrientes no meio de cultura é quase sempre necessário para o enraizamento das espécies cultivadas (Erig et al., 2004), verificou-se enraizamento mesmo em concentrações salinas baixas. Esses resultados podem ser decorrentes da presença de sacarose no meio, uma vez que 30 g L^{-1} é uma quantidade eficiente na promoção da energia requerida para a formação de raízes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Os resultados relativos ao comprimento da maior raiz foram estatisticamente iguais para as duas condições de luminosidade até a concentração salina de 30%. A partir dessa concentração plantas cultivadas sob luz VB apresentaram raízes mais longas, sendo o maior valor (1,7) obtido com 67% dos sais do meio MS (Figura 7).

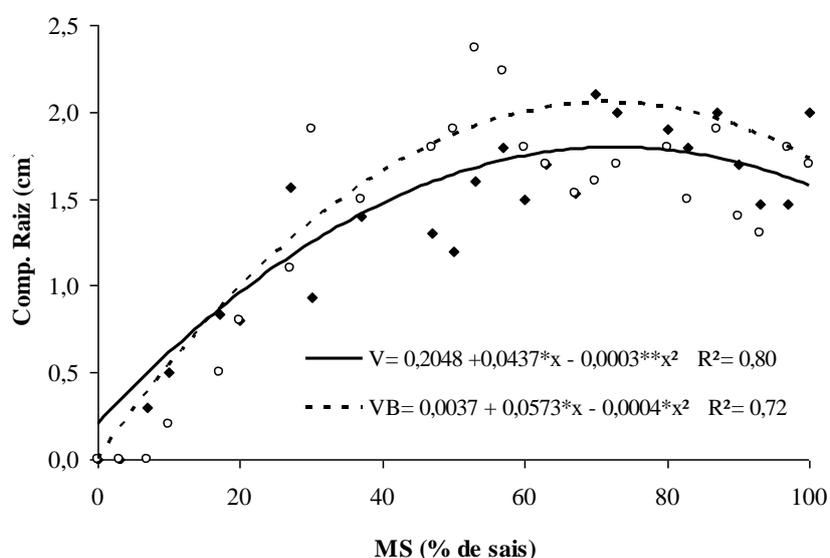


Figura 7 Comprimento da raiz de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Plantas cultivadas sob as duas condições de luminosidade, apresentaram massa fresca estatisticamente iguais até a concentração de 30%. A partir desse valor, plantas

cultivadas sob luz V apresentaram maior massa fresca que aquelas cultivadas sob luz VB, sendo o maior resultado (1,3g) obtido com 70% da concentração de sais e sob luz V(Figura 8).

Tamaki et al (2007), relataram que o melhor desenvolvimento de *Ananas comosus* ocorreu em meio MS com concentrações superiores a 1/5 e que concentrações menores macronutrientes limitaram o desenvolvimento da espécie. Muller et al (2007) também verificaram que o crescimento *in vitro* e o peso da massa fresca de *Miltonia flavescens* foi reduzido na ausência de sais do meio de cultura MS, não sendo registrada diferença estatística com a utilização de 50 ou 100% dos sais do meio MS.

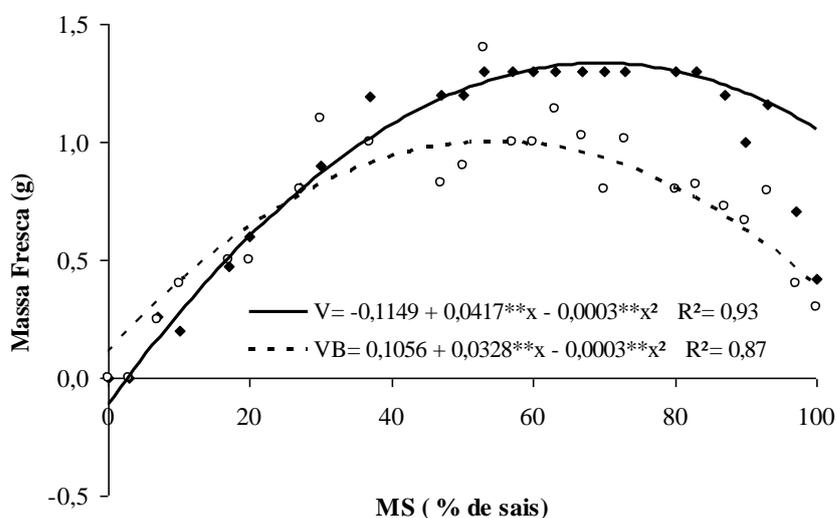


Figura 8 Massa fresca de plantas de *Cattleya nobilior* em função das condições de luminosidade e da concentração do meio MS. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Embora neste trabalho, sete das oito variáveis estudadas apresentassem maiores respostas morfogênicas quando cultivadas sob luz V (confirmando que comprimentos de onda relativos ao vermelho são responsáveis pela morfogênese de *C. nobilior*) os valores observados foram muito próximos ou em muitas vezes estatisticamente iguais quando as mesmas foram cultivadas sob luz VB, em concentrações salinas variando de 60 a 75%.

Em vista dos resultados observados pode-se recomendar a utilização de luz VB para o crescimento *in vitro* de *C. nobilior* como forma de minimizar os custos de produção.

CONCLUSÃO

A concentração de sais do meio MS variando de 60 a 75% propiciou incremento em todas as variáveis estudadas independentemente da condição de luminosidade.

A utilização de luminosidade de $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ propiciada por uma lâmpada fluorescente branca associada a uma lâmpada fluorescente vermelha é eficiente para o crescimento *in vitro* de *C. nobilior* minimizando os custos de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONOPOULOU, C. et al. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Thessaloniki, v.48, p.549-553, 2004.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, J. D.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Ceres**, Viçosa, v.56, p.542-546, 2009.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-296.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N., PESSOA, E. M.; FORSTER, W. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acessado em: 29 abr. 2013.
- BESPALHOK, J. C. B. F.; VIEIRA, L. G. E.; HASHIMOTO, J. M. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, p. 59-61, 1993.
- BHADRA, S.K.; HOSSAIN, M.M. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. **Plant tissue culture**, v.13, p.167-171, 2003.
- BIANCHETTI, L.B.; *Cattleya nobilior* Rchb.f. **Heringeriana**, Brasília, v.1, p.9-10, 2007.
- BOLDRINI, R.F.; SANTOS, W.O.; CRUZ, Z.M.A.; RAMOS, A.C. Bases da associação micorrízica orquídeide. **Natureza on line**, v.8, p.140-145, 2010.
- BRESSAN, E. A.; LEE, L. L.; SEVERO, V. S.; GERALD, L. T. S. Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro* – efeito do carvão. In: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1999. p. 111.

CASTRO, K. G. da S. de; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Multiplicação *in vitro* de *Limonium brasiliensis* (BOISS.) Kuntze: diferentes concentrações de BAP e sais minerais no meio de cultura. In: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 14; Congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 132.

CYBULARZ-URBAN, T.; HANUS-FAJERSKA, E.; SWIDERSKI, A. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.49, p.113-118, 2007.

DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F. E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v.3, p. 123-130, 2000.

DIÁZ-PÉREZ, J.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, G. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.9, p.225-232, 1995.

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, Sarasotav.26, p.155-158, 2005.

DREW, R.A. The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, n.62, p.551-556, 1987.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira ‘Batum’ (*Rubus idaeus* L.) **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v.27, p.488-490, 2005

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; CHAVES A.C.; Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs MC e ADAMS, utilizadas como porta-exerto para pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, p.61-68, 2004

FARIA, R. T. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012.124p.

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (*Statistical Analysis Software*) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3. Universidade Federal de Lavras, 2010.

FORNI, R. C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio “MS” na micropropagação do café ‘Catuaí’. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, p.468-474, 1996.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, p.801-807, 2012.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, Boston, v.53, p.202-215, 1972.

JOHNSON, T.R.; KANE, M.E.; PÉREZ, H.E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regulation**, v.63, p.89-99, 2011.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Análise conjuntural do comércio do comércio exterior da floricultura brasileira. **Ibraflor**, Holambra. 2010. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=8>>. Acessado em: 2 set. 2012.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 2005. 254p.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 431p.

KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua. 2011. 383p.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth regulator**, Farnham Royal, v.28, p.133-142, 1999.

MATTIUZ, C. F. M.; RODRIGUES, T. J. D.; MATTIUZ, B. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.12, p.21-30, 2006.

McKENDRICK, S.L.; LEAKE, J.R.; TAYLOR, D.L.; READ, D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.145, p.523-537, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. Instrução normativa nº 6 de 23 de setembro de 2008. Acesso: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.3-35. 2003.

MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A.R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens* **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 252-254, 2007

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

NORTON, C.R.; NORTON, M.E.; HERRINGTON, T.; PHILLIPS, D. Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, p.413-416, 1988

RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil**, v.244, p.149-163, 2002.

RASMUSSEN, H.N.; RASMUSSEN, F.N. Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. **Lankesteriana**, v.7, p.334-341, 2007.

RIBEIRO, L.S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; ARANTES E.S.; CHAGAS, E.A.; Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, v.3, p.107-112, 2002.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. H.; DIAS, J. M. M.; VILLANI, V. M. A. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídeas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.59, p.1-8, 2012

SAHA, D.; RAO, A.N. Studies on endophytic mycorrhiza of some selected orchids of Arunachal Pradesh – 1. Isolation and Identification. **Bulletin of Arunachal Forest Research**, Bangalore, v.22, p.9-16, 2006.

SCHUERGER, A.C. et al. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annum*L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v.79, p.273-282, 1997.

SORACE, M.; FARIA, R.T.; JÚNIOR, C.V.D. GOMES, G.P.; BARBOSA, C.M.; VIEIRA, F.G.N.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A.; SCHNITZER, J.A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 775-782, 2008

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae): effects of macro and microelements. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 11, p. 41-43, 1996.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Michigan Botanist**, Michigan, v.3, p.104-19, 1964.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar ‘Smooth Cayenne’ em diferentes concentrações de macronutrientes **Hoehnea**, São Paulo, v. 34 p.67-73, 2007

TAVEIRA, J. A. M. Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: GERALD, L.T.S. **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, 2011, 383p.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação da amoreira-preta “ÉBANO” em diferentes concentrações de meio MS e BAP *in vitro* **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 582-589, 2005