

Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial

Renato Fernandes Galdiano Junior*, Cibele Mantovani, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br

Resumo

A utilização de meios nutritivos formulados a partir de fertilizantes comerciais pode representar uma alternativa simples e de baixo custo para a propagação de orquídeas de interesse comercial. O presente estudo objetivou avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya trianaei* nos meios nutritivos MS reduzido e obtidos a partir do fertilizante Peters® NPK 10-30-20 em diferentes doses. Protocormos de 90 dias de idade com dois folíolos foram transferidos para cinco tratamentos (T1 – MS reduzido; T2 – Peters® 1 g L⁻¹; T3 – Peters® 2 g L⁻¹; T4 – Peters® 3 g L⁻¹ e T5 – Peters® 5 g L⁻¹), dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições contendo 25 plântulas para cada tratamento e incubados durante 180 dias, com repicagens a cada 60 dias, quando foram avaliados o número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas, altura da parte aérea e massa de matéria fresca da planta inteira. O meio de cultura simplificado com fertilizante Peters® 3 g L⁻¹ apresentou resultados estatisticamente diferentes para as características número de raízes, número de folhas, altura da parte aérea e massa de matéria fresca da planta inteira e pode ser recomendado para o crescimento *in vitro* desta orquídea ornamental.

Palavras-chave: micropropagação, meio de cultura simplificado, orquídea

In vitro propagation of *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) in culture media under commercial fertilizer concentrations

Abstract

The use of culture media produced with commercial fertilizers can represent a simple and low cost alternative for commercial orchid propagation. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* growth of plantlets of *Cattleya trianaei* in culture medium MS reduced and formulated with Peters® NPK 10-30-20 in different doses. 90 day-old plantlets with two leaflets were submitted to five treatments (T1 – reduced MS; T2 – Peters® 1 g L⁻¹; T3 – Peters® 2 g L⁻¹; T4 – Peters® 3 g L⁻¹ and T5 – Peters® 5 g L⁻¹) arranged in a completely randomized design with five replicates with 25 plantlets for each treatment and incubated during 180 days, with subcultures at each 60 days, when the number of roots, root length, number of leaves, shoot length and shoot fresh matter were evaluated. The simplified culture medium with fertilizer Peters® 3 g L⁻¹ presented results statistically different as for the number of roots, number of leaves, shoot length and shoot fresh matter and it can be recommended for *in vitro* growth of this ornamental orchid.

Keywords: micropropagation, simplified culture medium, orchid

Recebido: 25 Janeiro 2012
Aceito: 02 Maio 2012

Introdução

As orquídeas são cultivadas comercialmente no mundo inteiro como flores de corte ou envasadas e representam cerca de 8% do comércio de plantas ornamentais (Chugh et al., 2009). De grande beleza e importância comercial, *Cattleya trianaei* é uma orquídea nativa da Colômbia e encontrada nas regiões de Cundinamarca, Tolima, Vertente Oriental do Vale do Cauca, Caquetá Boyacá e Huila; é amplamente apreciada por colecionadores e base genética para grande número de híbridos (Oliveira, 1988; Chadwick & Chadwick, 2006).

A multiplicação vegetativa de orquídeas é realizada por meio de divisão de rizomas, o que representa uma maneira fácil e segura sob o ponto de vista genético, porém inviável comercialmente em razão de uma capacidade reprodutiva limitada e do grande período até a aquisição de um indivíduo adulto o qual poderá ser dividido (Faria et al., 2010). A reprodução via sementes ocorre naturalmente por meio da infecção por micorrizas uma vez que esta família evoluiu para a produção de grande número de sementes sem reservas nutritivas (endosperma), tornando-a dependente da infecção destes fungos para sua germinação (Roberts & Dickson, 2008).

Knudson (1922) propôs a germinação das sementes de orquídeas em meio nutritivo relativamente simples composto de alguns sais minerais e açúcar em uma cultura assimbiótica de sementes de *Cattleya mossiae*. A partir de então, a propagação de orquídeas em muito evoluiu e esta metodologia tornou-se uma das principais ferramentas para a propagação comercial dessas plantas.

Assim, a cultura de células e tecidos (micropropagação) configura-se como uma ferramenta essencial para a propagação massal dos principais gêneros de orquídeas comerciais. Em decorrência, diversas formulações químicas e substâncias complexas têm sido exploradas, como componentes dos meios nutritivos a fim de reduzir o tempo de cultivo *in vitro* e ampliar a qualidade de plantas produzidas (Arditti & Ernst, 1984).

Todavia, tais formulações encarecem essa técnica de propagação vegetativa. Stancato et al. (2008) propuseram que os meios nutritivos simplificados são de grande importância neste processo por representarem alternativas de baixo custo e resultados satisfatórios para membros do gênero *Cattleya*, que representam um dos mais cultivados.

Meios nutritivos simplificados representam aqueles formulados a partir de materiais corriqueiros e de baixo custo, quando comparados às formulações estabelecidas, entre esses têm-se as polpas de frutas (Stancato et al., 2008) e os fertilizantes comerciais, adicionados ou não as polpas de frutas (Junghans et al., 2009; Moraes et al., 2009). Caracterizando uma

importante estratégia para a obtenção de orquídeas com qualidade e redução de custos para propósitos de conservação ou comércio.

O meio de cultura mais utilizado para o cultivo *in vitro* é o MS (Murashige & Skoog, 1962) e para a propagação de orquídeas a formulação MS reduzida (com metade da dose dos macronutrientes) tem apresentado vantagens para o crescimento em relação à formulação original (Stancato & Faria, 1996; Oliveira & Faria, 2005; Unemoto et al., 2007).

De posse destes fatos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento de *Cattleya trianaei* em meio de cultura MS comparado com a formulação simplificada obtida com diferentes doses de fertilizante (NPK Peters®) para a propagação *in vitro* dessa orquídea comercial.

Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, pertencente ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, campus Jaboticabal - SP.

Cápsulas fechadas com sementes maduras obtidas por polinização artificial da espécie *Cattleya trianaei*, com nove meses após a fecundação, foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos, com posterior enxágue em água destilada, procedimento repetido três vezes, e autoclavada em câmara de fluxo (Faria, 1998). Cerca de 100 mg de sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 580 mL contendo 50 mL de meio nutritivo MS reduzido e autoclavados a 121 °C e 1,1 atm durante 15 minutos (Caldas et al., 1998).

O meio MS reduzido consistiu da formulação proposta por Murashige & Skoog (1962) com metade da dose de sais macronutrientes e dose total de micronutrientes suplementado com vitaminas, inositol e glicina (Costa et al., 2009), 2% de sacarose, pH ajustado para 5,7 e geleificado com 0,7% de ágar (tipo E, Sigma®). A germinação e crescimento ocorreram em sala de incubação sob condições controladas (com temperatura de 25 ± 2°C e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, 75 µmol m⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas luz).

Decorridos 90 dias, protocormos com cerca de 0,5 cm de altura e presença de dois folíolos foram transferidos para cinco diferentes tratamentos, compostos de meio MS reduzido, obtido a partir da redução pela metade da dose de macronutrientes (Tratamento T1) e meio nutritivo simplificado, formulado a partir do fertilizante Peters® NPK 10-30-20 (Spectrum Group, St. Louis, MO, EUA), entre as doses de 1 g L⁻¹ (T2), 2 g L⁻¹ (T3), 3 g L⁻¹ (T4) e 5 g L⁻¹ (T5). Para a

preparação destas doses, o fertilizante foi pesado e adicionado água destilada.

A todos os tratamentos, incluindo o meio de cultura MS reduzido, foram adicionados homogeneizado de banana (40,0 g L⁻¹), obtido a partir de frutos maduros, peptona (Sigma®, 1,0 g L⁻¹), carvão ativado (Sinth®, 2,0 g L⁻¹), pH acertado para 5,7, adicionado 7,0 g L⁻¹ de ágar, distribuído entre os frascos e autoclavados conforme condições acima descritas. A composição mineral, vitaminas e aminoácido do meio de cultura MS reduzido e meio de cultura simplificado (1,0 g L⁻¹ Peters® NPK 10-30-20) está descrita na Tabela 1.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto de cinco tratamentos com cinco repetições. Cada repetição foi constituída de 25 plântulas, somando 625 plântulas. A cada 60 dias as plântulas foram subcultivadas em um meio de cultura novo constituído dos mesmos tratamentos.

Após 180 dias do início do experimento nos diferentes meios de cultura, foi avaliado o crescimento *in vitro* a partir de medidas biométricas do número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF), altura da parte aérea (APA) e massa de matéria fresca da planta inteira – parte aérea e parte radicular (MMF). De cada frasco foram selecionadas, aleatoriamente, 15 plântulas para avaliação.

Tabela 1. Formulação dos meios nutritivos MS e dos fertilizantes comerciais Peters® (NPK 10-30-20) utilizados na micropropagação de *Cattleya trianaei*.

Componentes	MS ¹ reduzido	Peter's ²
Macro elementos	-----mg L ⁻¹ -----	
N-total	420,5	200
N-NH ⁴	144,5	98
N-NO ³	276	102
P	19,8	131
K	371,5	166
Ca	60	-
Mg	18	24
S	24	34
Micro elementos	-----mg L ⁻¹ -----	
B	1,08	0,14
Fe	5,60	1,00
Zn	1,95	0,05
Cu	0,01	0,07
Mn	5,49	0,50
Mo	0,10	0,02
Σ macro e micronutrientes	1 348,53	557
Aminoácidos e vitaminas	-----mg L ⁻¹ -----	
Myo-inositol	100	-
Glicina	2,00	-
Niacina	0,5	-
Piridoxina	0,5	-
Tiamina	0,1	-

Doses fornecidas por: ¹Costa et al. (2009), ²fabricante.

Os dados biométricos foram transformados em $(x + 1)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância de maneira a comparar as médias dos tratamentos das doses do fertilizante Peters® com o meio de cultura controle (MS reduzido). Para isso as médias foram separadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade por meio do programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NY, EUA).

Resultados e Discussão

Os resultados (Tabela 2) mostram que plantas de *Cattleya trianaei* cultivadas em meio nutritivo obtido a partir do fertilizante Peters® 3,0 g L⁻¹ ou 5,0 g L⁻¹ apresentaram resultados significativamente diferentes do meio nutritivo MS reduzido para número de raízes, altura da parte aérea, número de folhas e massa de matéria fresca (da planta total).

Quando analisado a promoção do crescimento do sistema radicular, o meio formulado com o fertilizante Peters® NPK 10-30-20 mostrou-se mais eficiente que o meio de cultura MS reduzido, embora tenha sido observada diferença entre as doses do fertilizante. O número de raízes aumentou com a maior adição de Peters®, enquanto o comprimento da maior raiz não apresentou diferença entre os tratamentos. Em estudo com meio de cultura obtido com o mesmo fertilizante comercial, a espécie *Cattleya walkeriana* obteve maior número de raízes na dose estimada de 3,55 g L⁻¹ (Rodrigues et al., 2012).

Assim, o presente resultado mostra que mesmo com comprimento de raízes similar ao meio de cultura MS reduzido, o número de raízes foi maior em meio de cultura com a dose 3,0 g L⁻¹ de Peters® NPK 10-30-20. Isso pode ser reconhecido como maior promoção de enraizamento, pois ainda que seja de mesmo tamanho, estão em maior quantidade quando crescidas nas doses 3,0 e 5,0 g L⁻¹ do fertilizante.

Considerando o fato de que orquídeas são propagadas por meio do cultivo *in vitro*, o qual depende de uma fase posterior de aclimatização em condições *ex vitro*, a produção de maior número de raízes está intimamente relacionada a maior sobrevivência em casa de vegetação (Chandra et al., 2010). Sob esta perspectiva, a maior produção de raízes promoverá maior superfície de contato, absorção de nutrientes e assim poderá auxiliar no estabelecimento em casa de vegetação.

A altura da parte aérea e massa de matéria fresca da planta total (parte aérea e parte radicular) apresentaram maiores crescimentos nas doses do fertilizante, enquanto o meio de cultura MS reduzido apresentou a menor eficiência para o crescimento dessas variáveis. Resultado similar foi obtido por Unemoto et al. (2007) com *Oncidium nanum* com a utilização de fertilizante NPK. Isso evidencia o efeito benéfico do emprego de fertilizantes para a micropropagação de orquídeas, pois podem

Tabela 2. Médias do número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF) e massa de matéria fresca da parte aérea e radicular juntas (MMF) de plântulas de *Cattleya trianaei*, após 180 dias de cultivo *in vitro*, em cinco meios nutritivos.

Tratamentos	NR	CMR (cm)	APA (cm)	NF	MMF (g)
T1 - Meio MS reduzido	3,57b	5,46a	3,983b	5,93b	0,11b
T2 - 1,0 g Peters® NPK 10-30-20 L ⁻¹	4,75ba	5,57a	4,52a	5,81b	0,19a
T3 - 2,0 g Peters® NPK 10-30-20 L ⁻¹	4,81a	5,2a	4,43a	6,11b	0,19a
T4 - 3,0 g Peters® NPK 10-30-20 L ⁻¹	5,81a	5,31a	4,55a	6,69a	0,20a
T5 - 5,0 g Peters® NPK 10-30-20 L ⁻¹	5,96a	5,14a	4,51a	6,84a	0,21a
CV (%)	12,9	25,22	3,84	9,25	27,4

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

favorecer o crescimento *in vitro* dessas plantas e possui as vantagens por ser de fácil preparo e fácil acessibilidade.

O número de folhas foi maior nos tratamentos T4 e T5 (3,0 e 5,0 g L⁻¹ de fertilizante Peters®, respectivamente). Esse resultado reforça o efeito positivo do fertilizante nessas doses para o crescimento geral de plantas de *Cattleya trianaei in vitro*. Menores doses do NPK (1,0 e 2,0 g L⁻¹) não diferiram do meio de cultura MS reduzido e são uma indicação que esses tecidos da planta também são favorecidos pela maior dose de sais minerais encontrada na faixa dos tratamentos T4 e T5.

O fertilizante Peters® apresenta quantidades mais balanceadas das duas fontes de nitrogênio (NH₄ e NO₃, Tabela 1). Conforme Moraes et al. (2009), quantidades desbalanceadas de nitrogênio nítrico e amoniacal são prejudiciais à micropropagação de plântulas de *Cattleya loddigesii*, fator esse que também pode ter influenciado o comportamento *in vitro* de *Cattleya trianaei*.

Os resultados observados neste estudo estão em desacordo com os apresentados por Oliveira & Faria (2005), os quais não recomendaram o meio constituído de fertilizante Peters® (sob a mesma dose da utilizada neste experimento, 3 g L⁻¹) para o crescimento da parte aérea e radicular de *Catsetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*, indicando que as exigências nutricionais são distintas entre os gêneros da Família Orchidaceae. Essa resposta destaca a especificidade do comportamento de plantas de orquídeas.

Semelhante aos resultados encontrados neste ensaio, Unemoto et al. (2007) verificaram em propagação de *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*, que a utilização de fertilizante comercial NPK 6-6-8 na dose de 3 g L⁻¹, apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação aos meios de cultura MS ou MS reduzido. A utilização de 3 g L⁻¹ do fertilizante Peters® NPK 10-30-20 para formulação de meio de cultura reflete também maior facilidade para preparação, pois não requer a obtenção de diversos sais minerais para a mistura e nem vitaminas, fatores que poderão auxiliar na redução de custos na técnica de micropropagação.

Conclusões

O meio de cultura formulado a partir do fertilizante Peters® NPK 10-30-20, na dose de 3 g L⁻¹, apresenta maior eficiência para o crescimento *in vitro* de *Cattleya trianaei* e pode ser uma alternativa recomendada para a propagação assimbiótica dessa espécie comercial.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa doutorado e produtividade em pesquisa.

Referências

- Arditti, J., Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. *Orchid Biology: reviews and perspectives-III*. Cornell University Press, Ithaca, USA. p. 177-222.
- Caldas, L.S., Haridasan, P., Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa CENARGEN, Brasília, Brasil. p. 87-132.
- Chadwick, A.A., Chadwick, A.E. 2006. *The classic Cattleyas*. Timber Press, Portland, USA. 251 p.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199-1205.
- Chugh, S., Guha, S., Rao, U. 2009. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae* 122: 507-520.
- Costa, M.A.P.C., Pereira, M.J., Rocha, M.A., Hansen, D.S., Alves, R.M.O., Souza, E.H., Garcia, F.R. 2009. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. (ed.) *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. EMBRAPA MFT, Cruz das Almas, Brasil. p.351-370.
- Faria, R.T. 1998. Micropropagação de *Dendrobium nobile in vitro*. In: Tombolato, A. F.C., Costa, A.M.M. (ed.) *Micropropagação de plantas ornamentais*. Instituto Agrônomo & Fundação IAC, Campinas, Brasil. p.63-67.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Carvalho, J.F.R.P. 2010. *Cultivo de orquídeas*. Mecenas, Londrina, Brasil.

208 p.

Junghans, T.G., Souza, A.S., Santos-Serejo, J.A., Souza, F.V.D. 2009. Redução de custos na micropropagação. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. EMBRAPA MFT, Cruz das Almas, Brasil. p.153-175.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1-25.

Moraes, C.P., Diogo, J.A., Martini, G.A., Martelini, M.A. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) a partir de fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências* 7: 67-69.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Oliveira, S.A.A. 1988. *Cattleya trianae* (LINDEN & RUCHB.F.) DUCH. *Boletim CAOB* 1: 6-8.

Oliveira, L.V., Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum Agronomy* 27: 1-5.

Roberts, D.L., Dixon, K.W. 2008. Orchids. *Current Biology* 18: 325-329.

Rodrigues, D.T., Novais, R.F., Alvarez, H.G., Dias, J.M.M., Otoni, W.C., Villani, E.M.A. 2012. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. *Revista Ceres* 59: 9-15.

Stancato, G.C., Abre, M.F., Furlani, A.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia* 67: 51-57.

Stancato, G.C., Faria, R.T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae). I: Effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11: 41- 43.

Unemoto, L.K., Faria, R.T., Vieira, A.N.S., Dalio, R.J.D. 2007. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira de Agrociência* 13: 267-269.