

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS EM MEIO DE CULTURA SIMPLIFICADO

IN VITRO PROPAGATION OF BRAZILIAN ORCHIDS ON A SIMPLIFIED CULTURE MEDIUM

Lilian Keiko Unemoto^{*1}; Ricardo Tadeu de Faria²; Ana Odete Santos Vieira³; Ronaldo José Durigan Dalio⁴

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar a propagação *in vitro* de orquídeas nativas, em meio de cultura com formulação simplificada, a fim de se obter plantas com qualidade e custo reduzido. Foram utilizados os meios de culturas MS, MS modificado com a metade dos macronutrientes e meio simplificado com adubo comercial de formulação NPK (6-6-8) 3 mL L⁻¹. Três espécies nativas do Brasil foram utilizadas: *Oncidium nanum*, *Laelia lundii* e *Cattleya forbesii*. Após 8 meses de cultivo *in vitro* foram avaliados: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e massa fresca total. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento com oito plântulas por repetição. O meio simplificado adicionado com adubo comercial de formulação NPK (6-6-8), pôde ser utilizado na propagação *in vitro* de *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*. Para a espécie *Laelia lundii*, os meios de cultura mais indicados foram MS e MS modificado com a metade dos macronutrientes.

Palavras-chave: Orchidaceae, micropropagação, crescimento, meio de cultura.

ABSTRACT

This work aimed to accomplish the *in vitro* propagation of Brazilian orchids on a simplified culture medium in order to acquire quality and economical propagation. The culture media tested were: MS, MS modified with half-macronutrients and a simplified culture medium with commercial fertilizer formulation NPK (6-6-8) 3 mL L⁻¹. Three Brazilian species were used: *Oncidium nanum*, *Laelia lundii* and *Cattleya forbesii*. The following variables were evaluated after 8 months from the beginning of the experiment: canopy height, number of roots, greatest root length, and a total fresh weight. A completely randomized block experimental design was used with 10 replications per treatment with 8 plants per replication. The simplified culture medium supplemented with commercial fertilizer formulation NPK (6-6-8) could be used to the *in vitro* propagation of the *Oncidium nanum* and *Cattleya forbesii*. The most indicated culture medium for the *Laelia lundii* were MS and MS modified with half-macronutrients.

Key-words: Orchidaceae, micropropagation, growth, culture medium.

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, porém, muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seu *habitat* e às coletas predatórias (COLOMBO et al., 2004).

Técnicas como a cultura de tecidos têm auxiliado na preservação destas espécies, tendo como uma de suas

principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas.

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, para aumentar principalmente a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (STANCATO et al., 2001).

A cultura assimbiótica ou semeadura *in vitro* de orquídeas constitui técnica relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes (MARTINI et al., 2001).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são conservadas em material vegetal *in vitro*. Por isso os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

A partir dos trabalhos de Lewis Knudson em 1922, que possibilitou a reprodução de orquídeas por sementes, cultivando em meio de cultura, muitos autores, têm sugerido diferentes formulações com a adição de sais minerais, hormônios e vitaminas, além da introdução de compostos orgânicos visando otimizar o desenvolvimento *in vitro* dessas plantas (CAMPOS, 2004). Trabalhos como o de RAMOS (1969) e DRONK (2004), têm buscado desenvolver diferentes formulações de meios de cultura, na tentativa de se obter meios eficazes e de protocolo simplificado, através da adição de substâncias alternativas, como água de coco e extratos de frutas e legumes.

A multiplicação e a produção de mudas de orquídeas são realizadas principalmente em laboratórios em vista da exigência de condições assépticas durante seu desenvolvimento. A demanda crescente por plantas e flores de orquídeas tem obrigado os produtores a comprar mudas de laboratórios especializados. Os investimentos em material, infra-estrutura e mão-de-obra especializada, obrigam esses laboratórios a minimizar as perdas e a maximizar a utilização dos fatores envolvidos na produção (STANCATO et al., 2001).

¹ Bióloga, Mestranda em Agronomia/ Fitotecnia. Universidade Estadual de Londrina, PR

² Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. do Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. CX 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR. E-mail: faria@uel.br

³ Bióloga, Profa. Dra. do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR

⁴ Biólogo, Universidade Estadual de Londrina, PR

Este estudo teve como objetivo realizar a propagação *in vitro* de orquídeas nativas do Brasil, em meio de cultura com formulação simplificada, a fim de se obter plantas com qualidade e menor custo.

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Londrina, Paraná. As orquídeas utilizadas foram *Oncidium nanum* Lindl., *Laelia lundii* Rich f. e *Cattleya forbesii* Lindl., todas epífitas nativas do Brasil.

As cápsulas fechadas destas plantas, contendo as sementes maduras foram coletadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% (v/v), por 30 minutos. Transcorrido este tempo, foram lavadas três a quatro vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram retiradas da cápsula e germinadas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), modificado com metade dos macronutrientes e acrescido de 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da inclusão do ágar.

Os frascos contendo as sementes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos sob temperatura de 26 ± 2 °C, 2.000 lux de luminosidade e fotoperíodo de 16 horas. Após obtenção das plântulas por germinação *in vitro*, foram selecionadas para o experimento as que apresentavam aproximadamente 0,8 ± 0,2 cm de altura. Em seguida, transferidas para os tratamentos: (T1) - meio MS, (T2) - meio

MS modificado com a metade dos macronutrientes, e (T3) - meio com formulação simplificada, contendo apenas adubo comercial de formulação NPK (6-6-8) na concentração de 3,0 mL L⁻¹. A todos estes meios foram adicionados sacarose, ágar e carvão ativado, nas mesmas concentrações descritas para o meio de germinação.

As plântulas, depois de repicadas em câmara de fluxo laminar, foram novamente acondicionadas em sala de crescimento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições contendo oito plântulas por repetição.

Oito meses após o início do experimento, avaliou-se a altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e massa fresca total de cada plântula. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e complementados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Após as medições, as mudas foram lavadas em água corrente e transplantadas em vasos de cerâmica, contendo fibra de coco como substrato e transferidas para casa de vegetação.

Os resultados da Tabela 1 mostram o efeito dos diferentes meios de cultura sobre as variáveis: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e massa fresca na propagação *in vitro* das espécies *Oncidium nanum*, *Laelia lundii* e *Cattleya forbesii*.

Tabela 1 - Valores médios de altura da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), número de raízes e massa fresca (g), de *Oncidium nanum*, *Laelia lundii* e *Cattleya forbesii*, após 8 meses do início do experimento.

Orquídeas	Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Número de raízes	Massa fresca (g)
<i>O. nanum</i>	T1	1,79 b ¹	1,24 a	0,16 b	2,50 b
	T2	2,10 ab	1,57 a	0,19 ab	2,93 ab
	T3	2,39 a	1,78 a	0,24 a	3,56 a
	CV (%)	26,02	31,15	49,03	39,17
<i>L. lundii</i>	T1	1,59 a	0,58 a	0,09 a	1,42 a
	T2	1,71 a	0,50 a	0,10 a	1,58 a
	T3	*	*	*	*
	CV (%)	-	-	-	-
<i>C. forbesii</i>	T1	2,25 b	1,90 b	0,15 b	1,76 b
	T2	2,48 a	2,28 a	0,17 ab	1,86 a
	T3	2,57 a	2,45 a	0,19 a	1,95 a
	CV (%)	20,26	30,12	30,43	17,8

¹Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. T1- meio MS; T2 – meio MS com metade dos macronutrientes; T3 – meio simplificado com adubo comercial NPK 6-6-8.

* Plântulas mortas.

Para a espécie *Oncidium nanum*, as plantas dos tratamentos T2 e T3 apresentaram as maiores médias em altura da parte aérea. As plantas cultivadas em meio à base de adubo NPK (6-6-8) (T3), apresentaram um maior desenvolvimento de parte aérea em relação ao meio MS (T1). Não foi possível verificar diferenças significativas no comprimento da maior raiz para os três tratamentos. Em estudos comparativos entre os meios MS, Knudson C, Vacin & Went e meios à base de adubo NPK (10-5-5) na concentração de 3,0 g L⁻¹ e NPK (10-30-20) na concentração de 3,0 g L⁻¹, OLIVEIRA & FARIA (2005), obtiveram as melhores médias de comprimento da maior raiz em meio com NPK (10-5-5), para as orquídeas *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*. Para as variáveis massa fresca total e número de raízes, as plantas cultivadas em meio à base de adubo NPK (6-6-8) (T3), apresentaram médias superiores em relação às plantas cultivadas em meio MS (T1). OLIVEIRA &

FARIA (2005), estudando a espécie *Catasetum fimbriatum*, obtiveram maior formação de número de raízes em meio MS modificado com a metade dos macronutrientes e com o meio à base de adubo NPK (10-30-20).

Os resultados para a espécie *Laelia lundii* mostram que as plantas tiveram um bom desenvolvimento nos tratamentos T1 e T2, sendo que todas as variáveis analisadas não apresentaram diferenças significativas. STANCATO & FARIA (1996), em estudos com a espécie *Laelia cinnabarina* Batem, obtiveram plantas mais vigorosas, quando cultivadas em meio de cultura MS modificado com a metade dos macronutrientes.

As plântulas de *Laelia lundii* que foram cultivadas em T3 não sobreviveram, morrendo aproximadamente 40 dias após o início do experimento. Tal resultado sugere que esta espécie requer um meio de cultura com maior complexidade de elementos, como os oferecidos pelo meio MS.

Para a espécie *Cattleya forbesii*, não houve diferença significativa entre os tratamentos T2 e T3, em todas as variáveis analisadas, porém, as plântulas do T1 (meio MS), apresentaram as menores médias para todas as variáveis testadas. DA SILVA (2003), obteve melhores resultados, na propagação *in vitro* de *Cattleya tigrina*. Utilizando um meio de cultura com fertilizante Dyna-Gro® (7-9-5), tomate e água de coco, quando comparado ao meio MS. DRONK (2004), também obteve melhores resultados na propagação de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f., utilizando meio de cultura com adubo Dyna-Gro® (7-7-7), acrescido de banana e água de coco.

Para as espécies, *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*, o meio MS (T1) foi o tratamento em que as plantas apresentaram um desenvolvimento vegetativo mais lento e cuja concentração de macronutrientes era maior em relação aos tratamentos T2 e T3.

O meio simplificado com NPK (6-6-8) (T3), apresentou, com exceção à espécie *L. lundii*, resultados semelhantes ao T2 (MS modificado com a metade dos macronutrientes). O meio simplificado, utiliza uma quantidade reduzida de elementos e de fácil acessibilidade. Além da facilidade do preparo e baixo custo dos componentes utilizados, outro fator favorável é a não utilização dos compostos, nitrato de amônia e nitrato de potássio, utilizados no meio MS e cuja obtenção é controlada pelo Ministério de Defesa que consta em Lei Federal nº 3665 de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000).

O meio simplificado com adubo foliar NPK (6-6-8) pode ser utilizado na propagação *in vitro* de *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*. Para a espécie *Laelia lundii*, os meios de cultura mais indicados são MS e MS modificado com a metade dos macronutrientes.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Defesa. Decreto-Lei n. 3665, de 20 de novembro de 2000. Estabelece critérios para o regulamento para fiscalização de produtos controlados. Acesso em: 07 jan 2007.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.

Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998, v.1, 864 p.

CAMPOS, D. M. Cultura *in vitro* simplificada. **O Mundo das Orquídeas**, São Paulo, n.36, p. 52- 53, 2004.

COLOMBO L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.. FONSECA, I.C.B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n. 2, p. 253-258, 2004.

DA SILVA, A. L. L. Avaliação de uma receita para o cultivo de orquídeas *in vitro*. **Orquidário**, Rio de Janeiro, v.17, n. 1, p. 28-30, 2003.

DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchb.f.** 2004. 30 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso e Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p. 1319-1324, 2001.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução por semente.** São Paulo: Ed. Saraiva. 1969. 163p.

OLIVEIRA, R. L.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.27, n.1, p. 1- 5, 2005.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.17, n.1, p. 25-33, 2001.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil.** São Paulo: Nobel, 1976.

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