

# Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea<sup>1</sup>

Donizetti Tomaz Rodrigues<sup>2</sup>, Roberto Ferreira Novais<sup>2</sup>, Víctor Hugo Alvarez V.<sup>2</sup>, José Maria Moreira Dias<sup>3</sup>,  
Ecila Mercês de Albuquerque Villani<sup>4\*</sup>

## RESUMO

Plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro* respondem de forma distinta aos vários meios de cultura empregados nessa técnica. Este trabalho comparou o meio nutritivo Knudson C, utilizado no cultivo de orquídeas, com o denominado MN e outros dois meios preparados com fertilizantes Peters<sup>®</sup>: NPK 10-30-20 + micronutrientes e NPK 30-10-10 + micronutrientes para o cultivo *in vitro* de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*), com seis meses de idade, germinadas sobre o meio Knudson C. Os três últimos meios foram testados com as seguintes doses de sais: 0,25; 0,50; 1,00; 1,75; e 2,25 g L<sup>-1</sup>, e o meio Knudson C, 2,0 g L<sup>-1</sup>. A todos os meios adicionaram-se 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 10 g L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH foi ajustado a 5,7. Aos meios MN e Peters<sup>®</sup> foram acrescentados 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 200 ml L<sup>-1</sup> de água de coco. Foram utilizados frascos de vidro de 320 mL contendo 35 mL de meio nutritivo, e o experimento foi mantido em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, 16/8 h luz/escuro e irradiação de 48 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Melhores respostas para produção de matéria fresca foram obtidas com os fertilizantes NPK, em comparação com os meios Knudson C e MN. A produção de matéria fresca aumentou linearmente com o aumento da dose de nutrientes nos meios MN e nos dois NPK. As plântulas de orquídea cultivadas em meio Knudson C apresentaram os menores valores para as variáveis avaliadas.

**Palavras-chave:** nutrição, micropropagação, Orchidaceae.

## ABSTRACT

### Chemical composition and component concentrations of culture medium for the *in vitro* growth of orchid

Orchid seedlings grown *in vitro* respond differently to the different culture media used for this technique. This study compares the traditional Knudson (KC) medium used in orchid *in vitro* cultivation with a new medium formulation based on the KC medium with modifications, which was named Novais medium (NM), and two other media prepared with NPK fertilizer in the formulations 10-30-20 + micronutrients and 30-10-10 + micronutrients. The media were tested for the *in vitro* growth of six-month-old orchid seedlings derived from the cross *Cattleya walkeriana* x *Cattleya loddigesii* 'Etibaia' and germinated in Knudson C medium. The KC medium was tested in the concentration of 2.0 g L<sup>-1</sup>, and the other three media were tested in the concentrations of 0.25; 0.50; 1.00; 1.75; and 2.25 g L<sup>-1</sup>. All the media were added with 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose, solidified with 10 g L<sup>-1</sup> agar and pH adjusted to 5.7. NM and Peters<sup>®</sup> media were added with 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 200 ml L<sup>-1</sup> of coconut water. The seedlings were cultured in 320 mL glass jars containing 35 mL of medium. The experiment was maintained in a growth room at 27±2 °C, 16/8 h photoperiod with 48 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> irradiance. The best responses for production of fresh matter were obtained using NPK fertilizers, in comparison with KC and NM medium. The fresh matter production increased linearly with increasing nutrients doses in both MN and KC media. The orchid seedlings grown in Knudson medium had the lowest means for the variables evaluated.

**Key words:** nutrition, micropropagation, Orchidaceae.

Recebido para publicação em 03/03/2010 e aprovado em 04/10/2011

<sup>1</sup> Extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Engenheiros-Agrônomos, Doutores. Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. donitom@yahoo.com.br; rfnovais@ufv.br; vhav@ufv.br

<sup>3</sup> Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. jmmdias@ufv.br

<sup>4</sup> Engenheira-Agrônoma, Doutora. Pós-doutoranda. Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ecilavillani@hotmail.com (\*autor para correspondência)

## INTRODUÇÃO

Inúmeros meios de cultivo são utilizados para a propagação germinativa ou clonal *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, com variada composição de sais, fontes de carbono, substâncias orgânicas, vitaminas e reguladores de crescimento (Arditti, 1992).

Os vários meios de cultura e as formulações NPK têm sido testados para diversos gêneros de orquídeas. O meio de cultura conhecido como MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizado com frequência nos trabalhos científicos, foi substituído por um meio desenvolvido por Novais & Rodrigues (2004), contendo macro e micronutrientes mais açúcar e ágar. Os resultados encontrados com a nova formulação foram tão bons como aqueles obtidos com o meio MS, extremamente complexo e de custo elevado. Esses autores verificaram que formulações comerciais de NPK simples, contendo impurezas de micronutrientes, também eram eficientes, apresentando melhores resultados que os meios mais complexos para a germinação de orquídeas *in vitro*.

Park *et al.* (2002), ao avaliarem a micropropagação *in vitro* de quatro variedades de *Phalaenopsis* cultivadas no meio MS, além de verificarem resposta altamente significativa à adição de BAP (88,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e ANA (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ao meio de cultivo, com produção de 10 a 13 protocórmios por explante em 12 semanas, também observaram que o uso de Hyponex® (1 g L<sup>-1</sup> de NPK 6,5-4,5-19 + 2 g L<sup>-1</sup> de NPK 20-20-20) como fonte de nutrientes promoveu resultados semelhantes aos encontrados com o meio MS.

Nessa mesma linha, Alam *et al.* (2002) verificaram que, na micropropagação de *Dendrobium transparens* Wall., melhores resultados em altura de planta, número de folhas e raízes e taxa de sobrevivência *ex vitro* foram obtidos com o uso do meio MS, em comparação com o meio Knudson C (Knudson, 1946) e os fertilizantes Hyponex® e OKF<sub>1</sub>. Todavia, o Hyponex®, apesar de diferir estatisticamente, apresentou resultados próximos àqueles encontrados para o MS e muito superiores em relação aos meios KC e OKF<sub>1</sub>.

No cultivo de *Cyrtopodium macranthos* Sw. em meio Hyponex® (N = 65 g kg<sup>-1</sup>; P = 60 g kg<sup>-1</sup> e K = 190 g kg<sup>-1</sup>) suplementado com peptona (3g L<sup>-1</sup>), ANA (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e BA (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) houve considerável multiplicação de protocórmios anteriormente obtidos de sementes maduras. Cada protocórmio deu origem a 10 outras plântulas, as quais foram transferidas para meio livre de hormônios, enraizadas e posteriormente transplantadas para casa de vegetação, com 80% de sobrevivência (Shimura & Koda, 2004).

Stancato & Faria (1996), trabalhando com *Laelia cinnabarina* Bateman ex Lindl., *in vitro*, estudaram o efeito da exclusão de nutrientes do meio de cultivo. Para isso utilizaram a solução de Hoagland & Arnon (1950) da seguinte forma: completa, menos micronutrientes e individualmente, excluindo-se: N, P, K, Ca, Mg e S. Além desses

nutrientes, utilizou-se como tratamento adicional o meio MS, com a metade da concentração original de macronutrientes (½ MS). Os resultados mostraram que a exclusão de N do meio foi a mais prejudicial, seguida por S, Ca e P (não houve diferença entre os três últimos), K e micronutrientes (não diferiram entre si) Mg completa e ½ MS.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro* a diferentes meios de cultivo e com a adição de fertilizantes NPK + micronutrientes em substituição aos meios de culturas tradicionais, como o MS.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste ensaio foram utilizadas plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*), provenientes de sementes com aproximadamente 0,5 cm de altura. Inicialmente, as plântulas foram cultivadas em meio Knudson C (Knudson, 1946), durante seis meses, no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Este ensaio foi constituído por um fatorial (3 x 5) + 1, sendo três meios de cultivo, cinco doses crescentes desses meios e um meio tradicional (Knudson C), com quatro repetições. Os meios de cultivo utilizados foram: meio Novais (MN) (Tabela 1); duas formulações do fertilizante Peters®: NPK 10-30-20 + micro (em g kg<sup>-1</sup>, N 100, P 130,9, K 166,0, Mg 0,6; e, em mg kg<sup>-1</sup>, B 68, Fe 500, Zn 25, Cu 36, Mn 250 e Mo 9) e NPK 30-10-10 + micro (em g kg<sup>-1</sup>, N 300, P

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura de Knudson C e Novais (MN) para recultivo *in vitro* de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*), em suas concentrações-padrão, utilizadas como referencial

Composição	Knudson C		MN	
	g L <sup>-1</sup>		g L <sup>-1</sup>	
Nitrato de cálcio	1,00		1,00	
Fosfato monobásico de amônio (MAP)	-		0,50	
Fosfato monobásico de potássio	0,25		-	
Sulfato de potássio	-		0,25	
Sulfato de magnésio	0,25		0,25	
Sulfato de amônio	0,50		-	
			mg L <sup>-1</sup>	
Sulfato ferroso	0,0250		0,0250	
Sulfato de zinco	-		0,0050	
Sulfato de manganês	0,0075		0,0075	
Ácido bórico	-		0,0050	
			g L <sup>-1</sup>	
Sacarose	20,0		20,0	
Ágar	10,0		10,0	
Carvão ativado	-		2,0	
Água de coco (mL)	-		200,0	

43,6, K 83,0, Mg 5; em mg kg<sup>-1</sup>, B 68, Fe 500, Zn 22, Cu 36, Mn 250 e Mo 9); e o meio Knudson C como referencial (Tabela 1). Em todos os meios foram adicionados 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 10 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck®, Alemanha) e o pH ajustado a 5,7. Aos meios MN e Peters® foram acrescentados 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 200 ml L<sup>-1</sup> de água de coco.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de sais de cada meio: 0,25; 0,50; 1,00; 1,75 e 2,25 g L<sup>-1</sup>, exceto no Knudson C (2,0 g L<sup>-1</sup>). A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro de 320 mL contendo 35 mL de meio nutritivo, com cinco plântulas do híbrido Etibaia. Quando repicadas para os frascos com o respectivo tratamento, essas foram separadas individualmente e limpas do ágar aderido às raízes.

As condições da sala de crescimento foram mantidas constantes a 27 ± 2 °C, com 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por tubos fluorescentes Osram®, 40 W luz do dia.

Ao final de seis meses foram avaliados: crescimento das plântulas quanto à produção de matéria fresca e seca de raízes e de parte aérea, comprimento e número de raízes, altura e número de unidades da parte aérea (formadas pelo limbo foliar mais pseudobulbo).

Os tecidos da parte aérea foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até peso constante, moídos e submetidos à digestão nítrico-perclórica para a determinação dos nutrientes. Os teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, B e Zn foram detectados por espectrometria de emissão óptica em plasma induzido (ICP) e de N pelo método semimicro-Kjeldahl (Embrapa, 1999).

A análise de variância e os contrastes (C<sub>1</sub> = K vs MN + P 10-30-20 + P 30-10-10; C<sub>2</sub> = MN vs P 10-30-20 + P 30-10-10; C<sub>3</sub> = P 10-30-20 vs P 30-10-10; e C<sub>4</sub> = K vs média da dose 2,25 g L<sup>-1</sup>) foram realizados com auxílio do programa SAEG 9.0, ajustando-se equações de regressão para as variáveis: produção de matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca de raízes (MFR), matéria fresca total (MFT), relação raiz:parte aérea (RA/PA), número de raízes (NR), comprimento médio de raízes (CMR), unidades de parte aérea (UPA), comprimento médio das unidades de parte aérea (CMUPA), número de unidades de parte aérea maiores que 2 cm (UPA > 2) e teores de nutrientes na parte aérea (pseudobulbos e folhas) das plântulas como variáveis de doses dos fertilizantes dentro dos diferentes meios de cultivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise dos contrastes observou-se maior produção de matéria fresca da parte aérea (MFPA) das plântulas por frasco com a utilização dos meios Novais (MN) e fertilizantes Peters®, não ocorrendo diferença significativa entre eles (Tabela 2). Comparando os efeitos da

maior dose dos fertilizantes, 2,25 g L<sup>-1</sup>, adicionada aos meios MN e Peters® em relação ao meio Knudson C (2,0 g L<sup>-1</sup>), percebe-se que a produção de MFPA foi menor (p < 0,01) com a utilização de Knudson C (Tabela 2). As equações obtidas com os resultados da produção de MFPA das plântulas para os fertilizantes Peters® foram lineares; para o meio MN, as respostas resultaram em um modelo cúbico, sendo as produtividades máximas estimadas iguais a 4,07; 3,70; e 3,11 g/frasco para MN, Peters® 10-30-20 e 30-10-10, respectivamente (Tabela 3).

Observaram-se diferenças significativas para a produção de matéria fresca de raízes (MFR) entre os diferentes meios, e nos MN e Peters® a produção de raízes foi maior que no Knudson C (Tabela 2). O Peters® resultou em maior produção de MFR quando comparado com o MN, porém entre as duas formulações de Peters® as diferenças não foram significativas. Apenas no meio com Peters® 30-10-10 observou-se incremento na produção de MFR com o aumento das doses (Tabela 3).

Em termos de produção de matéria fresca total (MFT), nos meios MN e Peters® as respostas foram lineares ao efeito de doses, sendo as produtividades máximas estimadas iguais a: 8,94; 9,65; e 9,18 g/frasco, para o MN, Peters® 10-30-20 e 30-10-10, respectivamente (Tabela 3). Para a média das doses, as formulações do fertilizante Peters® apresentaram produção significativamente maior que no MN (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Stancato *et al.* (2008) ao avaliarem a produção de matéria seca de plântulas de *Laelia longipes* Rchb. f. Esses autores verificaram que no meio Knudson C a produção de matéria seca foi 46% menor que a obtida em meio com formulação NPK 10-30-20.

A relação raiz/parte aérea (R/PA) foi menor no meio Knudson; entretanto, comparando-se apenas o meio Knudson C com os demais, na dose 2,25 g L<sup>-1</sup> a diferença para esse contraste não foi significativa (Tabela 2). A R/PA como variável das doses do fertilizante Peters® 30-10-10 foi linear, com inclinação negativa, observando-se pequenas diferenças na relação R/PA entre doses (Tabela 3). Por outro lado, em MN e Peters® 10-30-20 os valores foram altos para essa relação, em doses baixas do Peters®, e decréscimo curvilíneo com o aumento de suas doses. Essa diferença no comportamento da relação R/PA para Peters® 30-10-10 pode ser uma resposta da planta à fonte de N no fertilizante (Cunha *et al.*, 2011). Segundo Majerowicz & Kerbauy (2002), para plantas do gênero *Catasetum* as fontes nítricas estimularam a produção de raízes. Os autores consideraram a possibilidade de fontes amoniacais restringirem o crescimento da parte aérea dessas plantas. Por outro lado, Marschner (1995) colocou que a fertilização nitrogenada promove menor relação R/PA, e os efeitos na diminuição da R/PA são mais frequentes com fontes amoniacais.

O número de raízes (NR) por frasco não diferiu quando comparados o meio Knudson C e a média dos demais. Entretanto, diferenças significativas ocorreram entre o MN e os meios com as formulações de Peters<sup>®</sup>, observando-se maior NR por frasco com o fertilizante 10-30-20 (Tabelas 2 e 3). Por outro lado, o comprimento médio de raízes (CMR) foi menor em Knudson C tanto quando se comparam as médias dos tratamentos como em relação aos tratamentos (meios) correspondentes à dose 2,25 g L<sup>-1</sup>. Rego-Oliveira & Faria (2005) verificaram, ao avaliarem o crescimento de *Catasetum fimbriatum* (E. Morren) Lindl. & Paxton empregando diferentes meios de cultivo, entre eles Knudson C e a formulação NPK 10-30-20, que o NR foi significativamente maior com a formulação 10-30-20. Todavia, com relação ao CMR, esses autores não encontraram diferença estatística entre os dois meios, resultado oposto ao obtido no presente trabalho.

O número de unidades da parte aérea (UPA) foi, em média, maior com o uso do meio MN e dos fertilizantes Peters<sup>®</sup> em relação ao meio Knudson C. O efeito de doses foi significativo, apresentando aumento no número de UPA; entretanto, não houve, para média das doses, diferenças significativas entre o MN e os meios com as formulações Peters<sup>®</sup> (Tabela 2).

Para o comprimento médio de unidades da parte aérea (CMUPA) foram encontrados valores significativamente maiores para o meio Knudson C em relação aos demais (Tabelas 2 e 3). No meio MN, os valores de CMUPA foram menores quando comparados àqueles das duas formulações Peters<sup>®</sup>; entre essas formulações não foi encontrada diferença significativa.

A literatura salienta a importância de que as *vitro*-plantas de orquídeas alcancem tamanho adequado (acima de 2 cm de altura e com raízes) para serem retiradas dos frascos

de cultivo, de modo a otimizar sua adaptação às condições de cultivo *ex vitro*. Para esta variável, a diferença significativa ( $p > 0,001$ ) encontrada entre o meio Knudson C com a média dos demais meios, na dose 2,25 g L<sup>-1</sup>, aparentemente reflete a maior concentração de nutrientes nesses meios (Tabela 2).

Os teores de N na parte aérea das plântulas diferiram significativamente ( $p > 0,001$ ) entre MN, as duas formulações de Peters<sup>®</sup> e o meio Knudson (Tabela 4). Todavia, o teor médio encontrado em Peters<sup>®</sup> 30-10-10 foi superior àquele obtido para Peters<sup>®</sup> 10-30-20 e MN, com resposta linear para doses, tendo as curvas apresentando comportamentos semelhantes para MN e Peters<sup>®</sup> 10-30-20 (Tabela 5). Os teores máximos de N para MN, Peters<sup>®</sup> 10-30-20 e 30-10-10 foram, respectivamente, 16,3; 15,7; e 27,6 g kg<sup>-1</sup>. Para Majerowicz *et al.* (2000), o teor de N na parte aérea de orquídeas é dependente da forma de N predominante no meio, o que pode estar interferindo nos resultados encontrados.

Diferenças significativas entre os teores de P nas plântulas foram encontradas entre as formulações Peters<sup>®</sup> ( $p > 0,001$ ) e na comparação entre o meio Knudson C e a média da dose 2,25 g kg<sup>-1</sup> ( $p > 0,01$ ) (Tabela 4). Comportamento linear foi observado com a utilização de Peters<sup>®</sup> 10-30-20 e MN, com teores máximos de P de 8,2 e 7,0 g kg<sup>-1</sup> nas plântulas, valores esses elevados se comparados com os obtidos em Peters<sup>®</sup> 30-10-10, em média 3,3 g kg<sup>-1</sup> (Tabela 5). Rodrigues *et al.* (2012) observou a mesma tendência para *Cattleya walkeriana* Gardner. Jones Jr. *et al.* (1991) consideram que os teores adequados de P, para *Cattleya*, encontram-se na faixa de 1,0 a 7,5 g kg<sup>-1</sup>.

Apenas entre as formulações de Peters<sup>®</sup> não foi detectada diferença estatística entre os teores de K nas plântulas do híbrido Etibaia (Tabela 4). A utilização de doses crescentes de Peters<sup>®</sup> 30-10-10 resultou em uma

**Tabela 2.** Contrastes médios para as variáveis: massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA), de matéria fresca de raízes (MFR), de matéria fresca total (MFT), relação raiz/parte aérea (R/PA), número de raízes por frasco (NR), unidades de parte aérea por frasco (UPA), comprimento médio de raízes (CMR), comprimento médio das unidades de parte aérea (CMUPA) e número de UPA maiores que 2 cm por frasco (UPA > 2) de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) submetidas aos diferentes meios de cultivo

Contraste <sup>(1)</sup>	MFPA	MFR	MFT	R/PA	NR	UPA	CMR	CMUPA	UPA>2
	g/frasco						cm/frasco		
C <sub>1</sub>	0,87**	2,53**	3,40***	0,92 <sup>o</sup>	6,05 <sup>ns</sup>	3,98*	2,03*	-0,35 <sup>o</sup>	0,77 <sup>ns</sup>
C <sub>2</sub>	0,02 <sup>ns</sup>	0,91*	0,93 <sup>o</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	7,80**	0,65 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>ns</sup>	0,35***	2,80**
C <sub>3</sub>	0,16 <sup>ns</sup>	-0,63 <sup>ns</sup>	-0,47 <sup>ns</sup>	-1,34***	8,10*	3,40**	-1,40**	-0,09 <sup>ns</sup>	0,70 <sup>ns</sup>
C <sub>4</sub>	2,16***	2,16***	5,18***	-0,54 <sup>ns</sup>	8,75 <sup>ns</sup>	7,67**	1,23**	0,20 <sup>ns</sup>	6,42***

<sup>o</sup>, \*, \*\*, e \*\*\*, significativos pelo teste F a 10; 5,0; 1,0; e 0,1 %, respectivamente.

C<sub>1</sub> = K vs MN + P 10-30-20 + P 30-10-10; C<sub>2</sub> = MN vs P 10-30-20 + P 30-10-10; C<sub>3</sub> = P 10-30-20 vs P 30-10-10; C<sub>4</sub> = K vs Média da dose 2,25 g L<sup>-1</sup>. K = Knudson; MN = Meio Novais; P 10-30-20 e P 30-10-10 = Fertilizantes Peters<sup>®</sup> em suas formulações NPK 10-30-20 e 30-10-10, respectivamente.

<sup>(1)</sup> Os três primeiros contrastes comparam a resposta média das doses de cada meio e o quarto compara o Knudson C com a resposta para a última dose (2,25 g L<sup>-1</sup>) dos demais meios. Valores positivos indicam que o primeiro componente do contraste é menor do que o segundo componente da comparação.



**Tabela 3.** Equações de regressão ajustadas para produção de matéria fresca da parte aérea (MFPA), raízes (MFR) e total (MFT); relação raiz/parte aérea (R/PA), número de raízes (NR), unidades de parte aérea (UPA), comprimento médio de raízes (CMR) comprimento médio de UPA (CMUPA), número de UPA maiores que 2 cm (UPA > 2) e de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) cultivadas *in vitro* como variáveis das doses dos diferentes meios de cultivo

Meio	Equação	R <sup>2</sup>
<b>MFPA (g/frasco)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 1,29$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 1,755 - 5,055*x + 6,563**x^2 - 1,730**x^3$	0,978
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 0,385 + 1,477***x$	0,992
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 1,331 + 0,792***x$	0,898
<b>MFR (g/frasco)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 2,49$	
Meio Novais (MN)	$w = \bar{y} = 4,0$	-
Peters® 10-30-20	$w = \bar{y} = 5,6$	-
Peters® 30-10-10	$w = 3,911 + 0,958*x$	0,893
<b>MFT (g/frasco)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 3,78$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 4,067 + 2,168***x$	0,878
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 5,718 + 1,746**x$	0,912
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 5,242 + 1,751**x$	0,928
<b>R/PA</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 2,18$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 6,557 - 4,479**x + 0,920*x^2$	0,992
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 14,196 - 16,942***x^{0,5} + 5,729*x$	0,989
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 2,988 - 0,513*x$	0,630
<b>NR (unidades/frasco)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 45,0$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 58,748 - 86,911*x + 98,076*x^2 - 27,408*x^3$	0,808
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 17,032 + 54,866***x - 16,174**x^2$	0,896
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 57,7$	-
<b>CMR (cm)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 3,22$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 4,636 + 6,713***x - 8,001***x^2 + 2,164***x^3$	0,995
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 9,940 - 5,809**x + 1,495*x^2$	0,973
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 4,7$	-
<b>UPA (unidades/frasco)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 14,75$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 18,569 - 28,874**x + 35,629*x^2 - 9,590*x^3$	0,958
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 3,287 + 24,909***x - 7,779**x^2$	0,962
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 16,650 + 3,478**x$	0,756
<b>CMUPA (cm)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 2,69$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 1,219 + 1,407**x - 0,386*x^2$	0,977
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 0,824 + 3,595*x - 2,634*x^2 + 0,704*x^3$	1,000
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 2,103 + 0,268*x$	0,883
<b>UPA &gt; 2 (cm)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 10,25$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 0,952 + 7,128***x$	0,966
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = -2,334 + 21,17***x - 5,516**x^2$	0,997
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 7,634 + 4,057***x$	0,783

°, \*, \*\* e \*\*\*, significativos pelo teste F a 10; 5,0; 1,0; e 0,1 %, respectivamente.

curva raiz quadrada para K (Tabela 5); para os outros dois casos, MN e Peters® 10-30-20, o aumento do teor de K na parte aérea foi linear. Contudo, para o crescimento radicular observou-se redução no CMR com o

aumento da concentração de sais nos meios, o que poderia estar relacionado à concentração de K no meio. Figueiredo *et al.* (2008) atribuíram ao efeito tóxico do excesso de  $K_2SO_4$ , adicionado ao meio de cultura, a

**Tabela 4.** Contrastes médios para os teores de macro e micronutrientes na parte aérea de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) cultivadas *in vitro* como variáveis das doses dos diferentes meios de cultivo

Contraste	g kg <sup>-1</sup>					mg kg <sup>-1</sup>				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	B	Zn
C <sub>1</sub>	-3,33***	-0,08 <sup>ns</sup>	7,20***	-2,16**	-0,10 <sup>ns</sup>	-1,68***	-9 <sup>ns</sup>	-18 <sup>ns</sup>	-24 <sup>ns</sup>	7 <sup>ns</sup>
C <sub>2</sub>	1,62***	-0,08 <sup>ns</sup>	4,52***	-1,93***	0,08 <sup>ns</sup>	-0,72***	-4 <sup>ns</sup>	-7 <sup>ns</sup>	2 <sup>ns</sup>	-14***
C <sub>3</sub>	3,23***	-0,86***	-0,09 <sup>ns</sup>	-0,16 <sup>ns</sup>	-0,27**	-0,41**	-4 <sup>ns</sup>	8 <sup>ns</sup>	-2 <sup>ns</sup>	-3 <sup>ns</sup>
C <sub>4</sub>	-0,22 <sup>ns</sup>	0,95**	9,79***	-2,38**	0,06 <sup>ns</sup>	-1,34***	-17 <sup>ns</sup>	-17 <sup>ns</sup>	-27 <sup>ns</sup>	9 <sup>o</sup>

<sup>o</sup>, \*, \*\* e \*\*\*, significativos pelo teste F a 10; 5,0; 1,0; e 0,1%, respectivamente.

C<sub>1</sub> = K vs MN + P 10-30-20 + P 30-10-10, C<sub>2</sub> = MN vs P 10-30-20 + P 30-10-10; C<sub>3</sub> = P 10-30-20 vs P 30-10-10; C<sub>4</sub> = K vs Média da dose 2,25 g L<sup>-1</sup>.

K = Knudson, MN = Meio Novais, P 10-30-20 e P 30-10-10 = Fertilizantes Peters® em suas formulações NPK 10-30-20 e 30-10-10, respectivamente.

**Tabela 5.** Equações de regressão ajustadas para os teores de macronutrientes (g kg<sup>-1</sup>) na parte aérea de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) cultivadas *in vitro* como variáveis das doses dos diferentes meios de cultivo

Meio	Equação	R <sup>2</sup>
<b>N (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 20,17	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 6,210 + 4,470***x$	0,924
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 6,972 + 3,826***x$	0,911
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 7,576 + 8,920***x$	0,982
<b>P (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 4,36	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 1,426 + 2,498***x$	0,945
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 1,697 + 2,872***x$	0,996
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 3,3$	
<b>K (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 13,02	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 14,755 + 5,200**x$	0,931
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 16,478 + 12,224***x$	0,800
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 3,014 + 56,888*x^{0,5} - 25,996*x$	0,780
<b>Ca (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 13,43	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 20,790 - 24,920**x^{0,5} + 13,877**x$	0,828
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 9,728 - 1,52563*x$	0,5497
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 7,7$	-
<b>Mg (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 1,90	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 1,154 + 0,389**x$	0,758
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = 1,124 + 0,789***x$	0,887
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = -0,056 + 3,903*x^{0,5} - 2,075*x$	0,934
<b>S (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	y = 5,25	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 4,937 - 8,19*x^{0,5} + 5,355**x$	0,995
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = \bar{y} = 1,8$	-
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 1,0$	-

\*\*\*, \*\*, \* e °, significativos pelo teste F a 0,1; 1,0; 5,0; e 10 %, respectivamente.

redução no crescimento radicular de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.

Os teores de Ca foram menores na parte aérea das plântulas que receberam os fertilizantes Peters®, tendo entre esses, na formulação 10-30-20, obtido resposta linear decrescente com o aumento da dose (Tabelas 4 e 5). De modo geral, os teores de Ca encontrados na parte aérea dessas plântulas são considerados adequados (6-20 g kg<sup>-1</sup>) de acordo com a literatura (Jones Jr. *et al.*, 1991; Novais & Rodrigues, 2004), sendo o Ca disponibilizado pela água de coco adicionada ao meio que, proporcionalmente, contém um terço do teor de Ca do MN ou Knudson C (George, 1993). Por outro lado, o efeito de dose no caso do MN resultou em teores maiores quando comparado ao Peters®. As limitações do Peters®, provavelmente, serão maiores nas fórmulas ricas em P, tendo em vista sua incompatibilidade com Ca (precipitação). Nesse caso, problemas com deficiência de Ca deverão ser mais acentuados.

Para o Mg, maior teor foi observado na parte aérea das plântulas cultivadas no meio contendo Peters® 10-30-20, com resposta linear ao aumento da dose do fertilizante no meio de cultivo; resultado semelhante foi encontrado para MN (Tabela 5). Já os teores de Mg encontrados para o Peters® 30-10-10 apresentaram resposta definida por um modelo raiz quadrada, no qual os teores começaram a ter decréscimo em seu valor a partir 0,88 g L<sup>-1</sup> de fertilizante (Tabela 5).

Como já relatado, outra carência dos fertilizantes Peters® diz respeito a S, e neste trabalho os teores de S não variaram com a dose desse fertilizante no meio, apresentando valores baixos quando comparado com o teor encontrado com o uso de MN (Tabela 4). Os teores de S encontrados com o meio Knudson C foram superiores quando comparados com os fertilizantes Peters®. Tanto o meio Knudson C quanto o MN apresentam S em sua composição (Tabela 1), propiciando o resultado encontrado.

Os teores de macronutrientes nos meios Knudson C e MN são semelhantes (Tabela 1); entretanto, quando esses são comparados com os fertilizantes Peters® percebem-se grandes diferenças (ver concentração de nutrientes das formulações em Material e Métodos). Os teores de N e Mg no Peters® 30-10-10 são três e cinco vezes, respectivamente, maiores do que aqueles no Knudson e MN; no Peters® 10-30-20, os teores de P e K foram aproximadamente três vezes maiores neste último, sendo que em suas garantias o fabricante não inclui, no caso destas duas formulações, Ca e S.

Em média, os teores de Fe não apresentaram diferenças significativas entre os meios, tendo apenas para o Peters® 30-10-10 sido possível ajustar uma equação linear e decrescente (Tabela 6) indicando diluição do teor de Fe na planta em razão do maior crescimento (Tabelas 4 e 6). Tendência semelhante foi observada com os teores de Mn, não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4). Os dois nutrientes estão dentro da

**Tabela 6.** Equações de regressão ajustadas para os teores de micronutrientes (mg kg<sup>-1</sup>) na parte aérea de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) cultivadas *in vitro* como variáveis das doses dos diferentes meios de cultivo

Meio	Equação	R <sup>2</sup>
<b>Fe (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 109,15$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = \bar{y} = 96$	-
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = \bar{y} = 92$	-
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 109,749 - 22,473^{\circ}x$	0,845
<b>Mn (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 226,74$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = \bar{y} = 200$	-
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = \bar{y} = 178$	-
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = 6,275 + 415,375^{\circ}x^{0,5} - 200,575^{\circ}x$	0,693
<b>B (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 156,78$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 249,297 - 307,542^{\circ}x^{0,5} + 144,088^{\circ}x$	0,887
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = \bar{y} = 112$	
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = -60,190 + 381,503^{\circ}x^{0,5} - 187,992^{\circ}x$	0,846
<b>Zn (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
Knudson C (2 g)	$y = 26,04$	
Meio Novais (MN)	$\hat{y} = 42,31 + 14,26^{\circ}x$	0,75
Peters® 10-30-20	$\hat{y} = \bar{y} = 34$	
Peters® 30-10-10	$\hat{y} = \bar{y} = 29$	

faixa considerada suficiente por Jones Jr. *et al.* (1991), de 50-200 e 40-200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para Fe e Mn.

Os teores de B na planta são muito altos (Tabela 4) quando comparados aos teores adequados para plantas de orquídeas *ex vitro* (25-75 mg kg<sup>-1</sup> - Jones Jr. *et al.*, 1991), sendo que, em média, não houve diferença significativa entre os fertilizantes Peters® e MN (Tabela 4).

Para os teores de Zn foi possível ajustar um modelo apenas para MN, observando-se tendência linear com as doses crescentes desse meio, tendo na média das doses ele apresentado teores bem maiores do que aqueles encontrados com os demais tratamentos (Tabelas 4 e 6).

Os teores de nutrientes em Knudson C e MN são semelhantes, exceto para Zn e B, que não fazem parte do primeiro (Tabela 1). Comparando os teores de micronutrientes entre os meios Knudson C, MN e os fertilizantes Peters®, percebe-se que eles são bem maiores nos dois primeiros. Ferro e Mn apresentam, respectivamente, teores seis e quatro vezes maiores do que em Knudson C e MN em relação ao Peters®, e para Zn e B a diferença é ainda maior na comparação entre MN e os Peters®, tendo os teores no primeiro sido 39 vezes maiores, respectivamente (ver Material e Métodos). Essa comparação é necessária, tendo em vista que a resposta (teores no tecido vegetal) a esses diferentes teores nos fertilizantes foi significativa ( $p > 0,001$ ) apenas para Zn, mostrando que os teores dos demais nutrientes nas plântulas não variaram mesmo na presença de teores mais elevados no meio MN (Tabela 1) em relação aos fertilizantes Peters®.

## CONCLUSÕES

A matéria fresca total de plântulas do híbrido Etibaia (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*) aumenta linearmente com o aumento da dose nos meios MN e Peters®.

A utilização dos fertilizantes Peters® resulta em maior produção de matéria fresca de plântulas do híbrido do que os meios Knudson C e MN para a média das doses.

O meio MN apresenta respostas satisfatórias, com maior produção da parte aérea, sendo melhor alternativa aos atuais meios de cultivo, como o Knudson C.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pela concessão de bolsa de pós-doutoramento à Dra. Ecila Mercês de Albuquerque Villani.

## REFERÊNCIAS

Alam MK, Rashid MH, Hossain MS, Salam MA & Rouf MA (2002) *In vitro* seed propagation of dendrobium (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media. Biotechnology, 1:111-115.

Arditti J (1992) Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons. 691p.

Cunha T, Cordeiro GM, Massaro R, Dezan LF & Pedroso-de-Moraes C (2011) Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. Scientia Plena, 7:1-5.

Embrapa (1999) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 370p.

Figueiredo MA, Pasqual M, Araújo AG, Junqueira KP, Santos FC & Rodrigues VA (2008) Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. Ciência Rural, 38:255-257.

George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology. 2ª ed. Basingstoke, Exegetics Limited. 510p.

Hoagland DR & Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. 32p.

Jones Jr. JB, Wolf B & Mills HA (1991) Plant analysis handbook. Athens, Micro-Macro Publishing, Inc. 213p.

Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 15:214-217.

Majerowicz N, Kerbaux GB, Nievola CC & Suzuki RM (2000) Effects of nitrogen forms on dry matter partitioning and nitrogen metabolism in two contrasting genotypes of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Environmental and Experimental Botany, 44:195-206.

Majerowicz N & Kerbaux GB (2002) Effects of nitrogen forms on dry matter partitioning and nitrogen metabolism in two contrasting genotypes of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Environmental and Experimental Botany, 47:249-258.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press. 888p.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, 15:473-493.

Novais RF & Rodrigues DT (2004) Nutrição e fertilização de orquídeas. In: 4º Congresso Brasileiro de Botânica, Viçosa. Anais. Sociedade Botânica do Brasil. CD-ROM.

Park SY, Murthy HN & Paek KY (2002) Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 38:168-172.

Rego-Oliveira LV & Faria RT (2005) *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Acta Scientiarum: Agronomy, 27:1-5.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez V. VH, Dias JMM, Otoni WC & Villani EM de A (2012) Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. Revista Ceres, 59:9-15

Shimura H & Koda Y (2004) Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. Plant Cell Tissues Organic Culture, 78:273-276.

Stancato GC, Abreu MF & Furlani AMC (2008) Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Bragantia, 67:51-57.

Stancato GC & Faria RT (1996) *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. Lindleyana, 11:41-43.