

CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya loddigesii* (ORCHIDACEAE) SOBRE SUPORTES ALTERNATIVOS AO ÁGAR

Fabiana Regina Gallo¹, Betty Cristiane Kuhn², Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez³.

RESUMO

A sementeira, das espécies de orquídeas, é geralmente realizada sobre meios de cultura gelificados com ágar. Entretanto, quando de boa qualidade, o ágar representa um dos componentes com maior custo para a produção *in vitro* de orquídeas, tendo este estudo o objetivo de analisar o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio líquido, tendo como suporte a espuma de poliuretano ou o papel filtro. Na realização dos ensaios foram inoculadas 20 plântulas desta espécie sobre o meio de cultura "C" de Knudson gelificado com 3,5 g/L de ágar (Himédia®) (tratamento controle), ou sobre suportes de papel de filtro ou flocos de espuma de poliuretano, sem adição de ágar. Após 120 dias de cultura sob iluminação natural e de 25±3°C, as análises das plântulas revelaram que a massa fresca, a altura da parte aérea, o número de folhas e de raízes e o comprimento dessas não diferiram significativamente entre os três tratamentos aplicados, assim como o pH do meio de cultura, embora tenha se mantido mais estável nos meios líquidos do que gelificado. Portanto, ambos os suportes alternativos podem ser utilizados para o cultivo *in vitro* de *C. loddigesii*, especialmente devido ao menor valor monetário por litro de meio de cultura produzido.

Palavras-chave: espuma de poliuretano; orquídeas; papel de filtro.

IN VITRO GROWTH OF *Cattleya loddigesii*, (ORCHIDACEAE) ON POLYURETANE FOAM

ABSTRACT

The seeding of orchid's species is generally carried out on culture media gelled with agar. The agar is one of the components with higher cost for *in vitro* production of orchids. This study aimed to analyze the development of *Cattleya loddigesii* in liquid medium supported by polyurethane foam or paper filter. To conduct the tests, 20 seeds of this species were inoculated on "C" Knudson culture medium gelled with 3.5 g/ L of agar (Himédia®) (control) and on paper filter supports or polyurethane foam flakes, without the addition of agar. After 120 days under natural lighting culture and 25 ± 3 ° C of temperature, the analyzes of seedlings revealed that the fresh weight, height of aerial parts, number of leaves and roots and their length did not differ significantly among the three treatments applied, and the pH of the culture medium remained more stable in liquid media than gelled one. Therefore, both alternative supports may be used for *in vitro* culture of *C. loddigesii*, especially due to lower monetary value per liter of culture media produced.

Keywords: chopped (polyurethane) foam; orchid; filter paper.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cattleya* é tipicamente brasileiro, com origem na Bacia Amazônica (1), destaca-se pela beleza e grande porte de suas flores. A maioria das espécies tem alto potencial ornamental e importância econômica (2). *C. loddigesii* Lindl., a primeira orquídea introduzida nas casas de vegetação européias (3) tem seu valor ornamental devido ao porte

elegante, de até 40 cm de altura, e nas belas flores lilases com cerca de 10 cm de diâmetro .

Tanto o extrativismo das espécies de orquídeas nativas com valor ornamental, quanto a destruição contínua das florestas tropicais têm levado muitas destas espécies de orquídeas a sérios riscos de extinção. Para abrandar estas pressões, a propagação *in vitro* das espécies de orquídeas mostra-se como uma ferramenta muito importante para a produção de mudas em larga escala. Neste

¹. Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá.

². Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá.

³. Profa. Dra. em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia e Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI), Universidade Estadual de Maringá.



contexto, *C. loddigesii* destaca-se como uma das espécies de orquídeas mais estudadas quanto à influência dos fatores iluminação e nutrição sobre a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas (4-9). Entretanto, pouco são os estudos relacionados à influência dos fatores físicos, do meio de cultura, sobre o desenvolvimento inicial de tais espécies.

Já nos estudos pioneiros de Knudson (10), relacionados com a multiplicação de orquídeas, as formulações nutritivas eram gelificadas com ágar, para que as sementes e plântulas não ficassem submersas na solução nutritiva e em baixa concentração de oxigênio, o que poderia interferir negativamente em seu desenvolvimento. Desta forma, o meio de cultura gelificado tornou-se padrão para o cultivo de orquídeas *in vitro* (11).

No entanto, a utilização de ágar, quando de boa qualidade, em muito onera os custos finais da produção de mudas em larga escala, em geral com finalidade comercial. Todavia há a possibilidade de substituição do ágar por substratos alternativos como a vermiculita, a perlita ou a espuma de poliuretano embebidos com meio nutritivo, as quais proporcionariam decréscimo dos custos de produção e também a possibilidade de melhores resultados quanto ao desenvolvimento das plântulas (12). Ainda foi observado que o uso do meio de cultura líquido é mais eficiente para o cultivo *in vitro* de *C. loddigesii*, visto que torna os minerais mais acessíveis para as plântulas (7).

Dentre os suportes acima, a espuma de poliuretano tem sido utilizada em grande escala por laboratórios comerciais de cultivo de plantas (13) além de apresentar menor resistência ao desenvolvimento das raízes, proporcionando a captação de nutrientes necessários e, conseqüentemente, melhor desenvolvimento das plântulas de *Oncidium baueri* Lindl. (14).

Por sua vez, o uso de papel de filtro para a confecção de balsas ou suportes para explantes, de espécies diversas, é de uso comum nos laboratórios de cultura de tecidos vegetais, como, por exemplo, quanto à germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. (15), tanto pela facilidade e rapidez na execução das metodologias quanto por permitir o contato dos tecidos, em

desenvolvimento, com os constituintes do meio de cultura líquido.

Tendo em vista a necessidade de se propor técnicas eficientes e de baixo custo para a propagação de mudas de orquídeas em larga escala, este estudo objetivou analisar o desenvolvimento das plântulas de *C. loddigesii* cultivadas em meio líquido, tendo como suporte a espuma de poliuretano ou o papel filtro.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultivo de Orquídeas e Bromélias do Museu Dinâmico Interdisciplinar da Universidade Estadual de Maringá (Bloco O-33).

Sementes de *C. loddigesii* foram inoculadas em meio de cultura "C" de Knudson (1946), suplementado com 100 mL/L de água de coco (fruto verde) (16) e gelificado com 3,5 g de ágar (Himedia®). Após seis meses, as plântulas com uma a duas folhas foram repicadas para a mesma formulação nutritiva anterior gelificado (tratamento controle), ou mantido líquido na presença de dois tipos de suportes para as plântulas: flocos de espuma de poliuretano ou dobraduras de papel filtro. O pH do meio de cultura foi ajustado com KOH 1N para 5,3 antes da autoclavagem por 20 minutos a 1 atm. O experimento foi do tipo inteiramente casualizado, composto por quatro frascos-réplicas com 50 mL de meio de cultura e 20 plântulas, para cada tratamento.

Após 120 dias de cultivo sob iluminação natural (sem isolamento direta) e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, as plântulas foram retiradas dos frascos-réplicas e analisadas quanto à massa fresca individual, altura da parte aérea (altura da maior folha distendida), número de folhas, número de raízes e comprimento dessas. Em adição, o pH do meio de cultura foi medido ao final dos ensaios.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Assistat (versão 7.5 beta) e as médias comparadas pelo teste estatístico de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS

A análise das plântulas de *C. loddigesii* não revelou diferenças estatísticas entre ambos os tipos de suportes utilizados no meio de cultura, entre si ou quando comparados com o tratamento controle (meio de cultura gelificado) (Tabela 1). O uso da espuma de poliuretano como suporte para plântulas de orquídeas já havia sido proposto por Reuter (17), pois este possui espaços que permitem

melhor absorção de nutrientes e água presentes no meio de cultura. Resultados semelhantes entre o uso de papel filtro e ágar também foram obtidos para a germinação *in vitro* das sementes de *Pinus taeda* (Pinaceae) (15).

Tabela 1. Análise das plântulas de *Cattleya loddigesii* sobre diferentes suportes, após 120 dias de cultivo *in vitro*

Parâmetros analisados/suporte	Ágar	Espuma de poliuretano	Papel de filtro	CV (%)
Massa fresca (g)	0,17 a	0,17 a	0,15 a	34,24
Altura da parte aérea (cm)	1,16 a	1,33 a	1,17 a	20,99
Número de folhas	4,38 a	4,15 a	4,67 a	12,23
Número de raízes	3,50 a	3,47 a	3,05 a	18,36
Comprimento das raízes (cm)	1,89 a	1,93 a	1,85 a	12,10
pH final do meio de cultura	3,00 a	3,23 a	3,31 a	8,69

CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os suportes de papel filtro e espuma apresentam a vantagem de não se deteriorarem durante o cultivo *in vitro*, fatores que prejudicam e até inviabilizam a continuidade dos experimentos (Figura 2), sendo este um aspecto positivo quando comparado a algumas fontes alternativas, como, por exemplo, o amido de milho devido a liberação de α -amilase pelas raízes de algumas espécies (18).

O número de raízes também não foi significativo para diferenciar os tratamentos,

entretanto estas se desenvolveram de maneira satisfatória, alcançando médias superiores a 3 raízes por plântula, sendo que o número de novas raízes formadas está diretamente relacionado à área de contato com o meio de cultura, refletindo em maior absorção dos nutrientes (8). Para explantes de outras espécies, como o café (19), foi verificado melhor desenvolvimento na ausência ou com baixa concentração de ágar, devido a maior facilidade de absorção de nutrientes e/ou reguladores de crescimento pelos tecidos vegetais.



Figura 2. Plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas sobre diferentes suportes (120 dias após inoculação). A: tratamento controle, gelificado com ágar; B: sobre suporte de espuma de poliuretano; C: sobre suporte de papel de filtro.



O crescimento de plântulas depende das características do substrato, sendo que este deve ter capacidade de retenção de nutrientes, economia hídrica, aeração, permeabilidade e também a capacidade tamponante para valor de pH (20). Na análise do pH dos frascos-réplica com plântulas de *C. loddigesii* (Tabela 1), após 120 dias de cultivo, observou-se que o meio de cultura líquido com suportes alternativos apresentou maior poder tamponante, quando comparado ao meio gelificado com ágar, embora sem diferenças estatísticas significantes. O pH é considerado um parâmetro de grande importância para a condução das culturas de tecidos vegetais *in vitro* e pode provocar efeitos diretos ou indiretos no desenvolvimento nos explantes (21). Para as culturas de orquídeas, o pH deve ser mantido entre 5,0 e 5,5, afim de que os processos fisiológicos e a captação de nutrientes pelas plântulas possam ocorrer normalmente.

Os resultados obtidos apresentaram pH abaixo dos valores de referência, processo que pode ocorrer devido a mudanças no meio de cultura durante o cultivo *in vitro*, entretanto, deve-se destacar que a diferença entre o pH entre os tratamentos não foi significativa, desta maneira, o suporte de espuma de poliuretano e o suporte de papel de filtro apresentam características equivalentes ao tratamento controle, com ágar.

Em geral não são discutidos os valores monetários de cada componente do meio de cultura, os quais podem ser elevados quando são produzidas plântulas *in vitro* em larga escala. Neste ensaio, para cada litro de meio de cultura gelificado com ágar obteve-se o custo final de R\$ 1,05, considerado alto, quando comparado aos outros suportes: R\$ 0,33 para o papel de filtro e R\$ 0,48 para a espuma de poliuretano. Outro fator que deve ser considerado é o tempo de preparo de cada frasco-réplica. Para as culturas gelificadas há a necessidade de aquecimento do meio até a completa dissolução do ágar, enquanto que para as culturas com suporte de papel de filtro há necessidade de tempo e habilidade para a realização das dobraduras do mesmo, a fim de que os suportes não alterem seu formato com o tempo e massa fresca das plântulas em crescimento. Por sua vez, a espuma de poliuretano pode ser facilmente adquirida no mercado na forma de pequenos pedaços (flocos), os quais devem ser embebidos no meio de cultura líquido com auxílio de bastões

de vidro mais grossos. Na busca por um substituto ao ágar pesquisadores concluíram que o amido de milho, apesar do baixo custo, apresenta maior dificuldade de elaboração, formando grumos que implicam em maior tempo de preparo dos frascos de cultura (18).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo por base as análises das plântulas de *C. loddigesii*, pode-se concluir que ambos os tipos de suportes, papel de filtro ou espuma de poliuretano, podem ser utilizados na elaboração de culturas assimbióticas, permitindo um desenvolvimento equivalente ao verificado no tratamento controle, gelificado com ágar. Entretanto, o baixo custo dos suportes alternativos, os tornam alternativas interessantes para o cultivo de orquídeas em larga escala.

MARIA AUXILIADORA MILANEZE-GUTIERRE

Endereço para correspondência: UEM. Departamento de
Biologia. Avenida Colombo, 5790, Bloco H67 (11)
Maringá - PR
87020-900
E-mail: milaneze@uem.br

Recebido em 19/10/2012

Revisado em 16/07/2013

Aceito em 19/06/2014

REFERÊNCIAS

- (1) _____ Disponível em: <<http://www.orchidstudium.com/Estrangeiras/Cattleya%20loddigesii.html>>. Acesso em: 01 setembro 2012.
- (2) VENTURA, G. M. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***, 2002. 159f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, 2002.
- (3) WITHNER, C. L. **The *Cattleyas* and their relatives: *Brassavola*, *Encyclia*, and other genera of Mexico and Central America**. v. 5. London: Timber Press, 1998.
- (4) FIGUEIREDO, M. A.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.255-257, 2008.
- (5) ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L. Y.; CASTRO, E. M.; ROCHA, H. S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.9, p.2506-2511, 2009a.
- (6) ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, G. C.; ZARRAGA, D. Z. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v.31, n.1, p.35-39, 2009b.
- (7) PASCOAL, M.; FIGUEIREDO, M. A.; REZENDE, J. C.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 211-216, 2009.
- (8) SOARES, J. D. R.; FILIPE, M. P.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; ARAÚJO, A. G. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.
- (9) GALDINO-JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, K.; 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, n.5, p.801-807, 2012.
- (10) KNUDSON L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214- 217, 1946.
- (11) SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Editora Nobel, 1979.
- (12) GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, p. 183-260,1998.
- (13) KIPP, J.; WEVER, G. Mezclas para nutrir y ayudar a crecer a las plantas: sustratos y turbas. *Horticultura: la industria del invernadero*. Ediciones de horticultura S.L. España, p. 112-117, 2000.
- (14) FARIA, R. T.; DALIO, R. J .D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. S. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.71-74, 2006.



- (15) GOLLE, D. P.; REININGER, L. R. S.; MUNIZ, M. F. B.; CURTI, A. R.; ROSA, F. C. Subsídio hídrico fornecido por substratos alternativos usados na germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.7, p.2218-2221, 2009.
- (16) ARDITTI, J.; CLEMENTS, G.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G.; ERNST, R. Orchid seed germination and seedling culture: A manual. In: Arditti J. (Ed). *Orchid biology: Reviews and perspectives II*. New York: Cornell University Press. p. 244-370, 1982.
- (17) REUTER, F.G. **Plant culture**. 1971. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US36082381971>>. Acesso em: 01 setembro 2012.
- (18) GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R.; CURTI, A. R.; HANAUER, J. G.; WALDOW, D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.1, p.39-48, 2010.
- (19) REZENDE, J. C.; PASCOAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento *in vitro* de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.9, p. 21-26, 2008.
- (20) FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de Orquídeas**. Londrina: Mecenaz, 2010.
- (21) TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, p. 87-132, 1998.