

Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco

In vitro propagation and acclimatization of *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) using banana pulp and coconut water

José Geraldo Zaparolli VIEIRA¹, Lilian Keiko UNEMOTO², Jorge Kaoro YAMAKAMI¹, Getulio Takashi NAGASHIMA¹, Ricardo Tadeu de FARIA³, Ricardo Sfeir de AGUIAR¹

¹ Eng^o Agr^o. Mestre em Agronomia, UEL, PR.. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina - PR.

² Bióloga, Mestre em Agronomia, UEL, PR.. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina - PR.

³ Eng^o Agr^o. Prof. Adjunto. Depto. Agronomia. Universidade Estadual de Londrina - PR. C.P. 6001. CEP 86051-990 Londrina. PR. e-mail: faria@uel.br (autor para correspondência).

Resumo

A água de coco e a banana estão entre os aditivos mais utilizados no meio de cultura para a propagação de diversas espécies de orquídeas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da suplementação do meio de cultura com água de coco e polpa de banana no crescimento *in vitro* de *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*. Os tratamentos avaliados foram: T1: testemunha; T2: 50 g L⁻¹ de polpa de banana; T3: 100 g L⁻¹ de polpa de banana; T4: 50 mL L⁻¹ de água de coco; T5: 50 g L⁻¹ de polpa de banana + 100 mL L⁻¹ de água de coco; T6: 100 g L⁻¹ de polpa de banana + 100 mL L⁻¹ de água de coco. O meio nutritivo utilizado foi o MS modificado com metade da concentração dos macronutrientes. Os parâmetros avaliados após seis meses do início do experimento foram: massa fresca; altura da parte aérea; comprimento da maior raiz; número de raízes, número de brotações e porcentagem de sobrevivência. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5%, de significância. Os tratamentos T3, T5 e T6 foram os que proporcionaram os melhores resultados para crescimento *in vitro* e aclimatização de *C. labiata* x *C. forbesii*.

Palavras-chave adicionais: cultura de tecidos; meios nutritivos; orquídeas.

Abstract

Coconut water and banana pulp are the most used additives in culture medium for the propagation of several species of orchids. The objective of this study was to evaluate the influence of coconut water and banana pulp on the *in vitro* growth of *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*. The evaluated treatments were as follows : T1 : control, T2 : 50g L⁻¹ of banana pulp, T3 : 100 g L⁻¹ of banana pulp, T4 : 50 mL L⁻¹ of coconut water ; T5: 50 g L⁻¹ of banana pulp + 100 mL L⁻¹ of coconut water, T6 : 100 g L⁻¹ of banana pulp + 100 mL L⁻¹ of coconut water. The culture medium used was the Murashige and Skoog modified with half of the macronutrients concentration. The following variables were evaluated after 6 months from the beginning of the experiment: total fresh weight, aerial part height, greatest root length, number of roots, and sprout number. The data were submitted to analysis of variance, and complemented by the comparison of means following Tukey's test procedures. The best results for the *in vitro* growth and acclimatization of *C. labiata* x *C. forbesii* were T3, T5 and T6.

Additional keywords: tissue culture; nutrient media; orchids.

Introdução

Flores perfeitas com delicada e exuberante coloração tornam as orquídeas umas das mais cobiçadas plantas ornamentais do mundo (ALTAFIN et al., 2004). O gênero *Cattleya* Lindl. possui cerca de 70 espécies e inúmeras variedades de híbridos, constituindo um dos mais populares e cultivados gêneros de orquídeas (RAPOSO, 1993). A espécie *C. labiata* Lindl. é nativa do Nordeste do Brasil, e o florescimento

ocorre no outono. A espécie *C. forbesii* Lindl. pode ser encontrada do litoral do Rio de Janeiro até Santa Catarina, e seu florescimento ocorre entre as estações de verão e outono (MILLER & WARREN, 1996).

A propagação *in vitro* é uma importante técnica que possibilita a produção de plantas em larga escala, num período reduzido de tempo e com maior qualidade das mudas em relação aos métodos convencionais (ZORNING, 1996). O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos

de cultura *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura. A formulação do meio de cultura é essencial para o desenvolvimento vegetativo e radicular, podendo conter diferentes combinações de nutrientes de acordo com os requerimentos de cada espécie (FARIA et al., 2002).

Várias combinações de elementos têm sido acrescentadas aos meios de cultura. Dentre os produtos mais citados estão: o extrato de levedura, folhas de fumo e malte, polpa de batata e banana, água de coco e suco de tomate (CALDAS et al., 1998). A água de coco compreende uma complexa mistura de elementos orgânicos e inorgânicos, tendo uma importante ação tamponante, é rica em magnésio e fosfato, possui uma quantidade de açúcar próxima a 2,5% e, além disso, é rica em nitrogênio não protéico na forma de aminoácidos (KRIKORIAN, 1991).

De acordo com ARDITTI & ERNST (1992), outro aditivo que vem sendo utilizado nos meios de cultura é a polpa de banana, rica em potássio, fósforo e magnésio e também em algumas vitaminas como: vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina e vitamina C. A adição de água de coco e polpa de banana em meios de cultura vem sendo utilizada para o cultivo de orquídeas do gênero *Paphiopedilum* (HUANG et al., 2001), *Dendrobium* (SHU et al., 2004), *Laelia* e *Miltonia* (STANCATO et al., 2008) demonstrando ótimos resultados.

O processo de transferência das plântulas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (casa de vegetação) é denominado de aclimatização (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). De acordo com DONNELLY & VIDAVER (1984), esta fase constitui um dos maiores limites à produção comercial de plantas propagadas assepticamente e à baixa sobrevivência de plantas quando transferidas do meio de cultura ao solo.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da suplementação do meio nutritivo com água de coco e polpa de banana no crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*.

Material e métodos

Foram utilizadas plântulas do cruzamento *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii* com altura média de $1,0 \pm 0,5$ cm, obtidas por sementeira *in vitro* a partir de cruzamentos controlados realizados na casa de vegetação, seguindo a metodologia descrita por FARIA (1998).

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), modificado com a metade da concentração dos macronutrientes e suplementado com 1 g L^{-1} de carvão ativado.

Os tratamentos utilizados foram: T1: MS (testemunha); T2: MS + 50 g L^{-1} de polpa de banana; T3: MS + 100 g L^{-1} de polpa de banana; T4: MS + 50 mL L^{-1} de água de coco; T5: MS + 50 g L^{-1} de polpa de banana + 100 mL L^{-1} de água de coco; T6: MS + 100 g L^{-1} de polpa de banana + 100 mL L^{-1} de água de coco. Para os tratamentos com banana, foi utilizada a cultivar nanica no ponto de maturação do verde para o amarelo e a polpa obtida por processamento em liquidificador. A água de coco foi obtida a partir de frutos verdes, sendo filtrada previamente em papel-filtro antes de ser adicionada ao meio de cultura.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e solidificado com $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. O meio foi distribuído em frascos de 250 mL de capacidade, sendo utilizados 50 mL de meio por frasco. Após este processo, os vidros foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 atm) por 20 minutos. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A avaliação foi feita seis meses após o início do experimento. Os parâmetros avaliados foram: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, número de brotações e massa fresca total. As mudas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultura e foram aclimatizadas em bandejas de isopor contendo fibra de coco como substrato. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com 50% de luminosidade, regadas manualmente, diariamente, e adubadas semanalmente com 3 g L^{-1} de adubo foliar NPK 6:6:8. A avaliação da porcentagem de sobrevivência das plântulas foi realizada após seis meses do plantio das mudas nas bandejas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo 6 tratamentos, com 10 repetições, contendo 12 plântulas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância (BANZATTO & KRONKA, 1995).

Resultados e discussão

Os valores da Tabela 1 evidenciam que houve influência dos diferentes tratamentos em todos os parâmetros avaliados para o híbrido de *Cattleya*, após quatro meses do cultivo *in vitro*.

Os dados relativos à massa fresca total indicam que os melhores tratamentos foram T3 e T6, sendo que as plântulas do tratamento T6 apresentaram o dobro em ganho de massa fresca em relação à testemunha (T1).

Tabela 1 - Valores médios de massa fresca, altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e número de brotações, para *C. labiata* x *C. forbesii*, após seis meses do início do experimento. *Fresh weight, aerial part height, length of the longest root, number of roots, and number of sprouts in 6 month old C. labiata* x *C. forbesii* plants growing in different culture media.

Tratamentos	² Massa fresca (g)	² Altura da parte aérea (cm)	² Comprimento da maior raiz (cm)	^{1,2} Número de raízes	^{1,2} Número de brotações
T ₁	0,36 c	2,67 d	3,25 d	4,07 b	1,39 a
T ₂	0,43 bc	2,78 cd	4,96 bc	5,05 a	1,23 ab
T ₃	0,68 a	4,03 a	7,03 a	5,74 a	1,23 ab
T ₄	0,34 c	2,80 cd	4,01 cd	5,21 a	1,31 ab
T ₅	0,66 ab	3,69 ab	6,53 ab	5,73 a	1,35 a
T ₆	0,87 a	3,66 ab	7,42 a	5,76 a	1,39 a
CV %	26,72	11,86	18,91	14,64	11,57

¹ dados transformados para raiz quadrada de $y + 0,5$.

² Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5%.

Legenda: T₁: testemunha; T₂: 50 g L⁻¹ banana; T₃: 100 g L⁻¹ banana; T₄: 50 mL L⁻¹ água de coco; T₅: 50 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ água de coco; T₆: 100 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ água de coco.

¹ data transformed into square root of $y + 0.5$

² Means in a column followed by the same small letter do not differ at the 5% level of probability according to Tukey's test

Legend : T₁ : check treatment. T₂ : 50 g L⁻¹ banana. T₃ : 100 g L⁻¹ banana. T₄ : 50 mL L⁻¹ coconut water. T₅ : 50 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ coconut water. T₆ : 100 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ coconut water.

DRONK (2004), trabalhando com a orquídea *Cattleya amethystoglossa*, obteve ótimos resultados no aumento da massa fresca em meio de cultura suplementado com 150 g L⁻¹ de polpa de banana nanica e 150 mL L⁻¹ de água de coco, observando aumento 55% acima daquele obtido pelas plântulas do tratamento-testemunha.

SHIAU et al. (2002) obtiveram ótimos resultados na propagação da orquídea *Anoectochilus formosanus* adicionando 8% de polpa de banana homogeneizada e 0,2% de carvão ativado ao meio MS. Os autores constataram ótimo desenvolvimento vegetativo, com índice de massa fresca de 352% acima da testemunha.

Para as variáveis altura da parte aérea e comprimento da maior raiz, os melhores tratamentos foram T₃, T₅ e T₆, sendo que, no tratamento T₁, as plântulas mostraram o menor desenvolvimento para estes parâmetros. Da mesma forma, SILVA et al. (2005) obtiveram maior comprimento de raízes em plântulas cultivadas em meios de cultura contendo polpa de banana (100 g L⁻¹).

Avaliando-se o número de raízes, os tratamentos T₂, T₃, T₄, T₅ e T₆ proporcionaram a maior quantidade de raízes, enquanto no tratamento T₁ foi o que apresentou número de raízes significativamente menor que os demais tratamentos (Tabela 1); da mesma forma, ARAÚJO et al. (2006), em estudos com meio de cultura para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya*, observaram maior número de raízes formadas nos meios contendo a combinação de 50 ou 100 g L⁻¹ de polpa de banana com

100 mL L⁻¹ de água de coco, sendo os menores valores obtidos em meios sem a polpa de banana. De acordo com NUNES et al. (2008), o efeito estimulatório da água de coco pode ser explicado pelos elevados teores de glicose, frutose e sais minerais, além de hormônios vegetais, necessários ao processo de formação e desenvolvimento de plântulas. Em relação à concentração de polpa de banana, SEENI & LATHA (2000) observaram maior número de raízes, quando o meio nutritivo continha 35 g L⁻¹ de polpa.

Não houve diferenças estatísticas para o número de brotações das plântulas em todos os tratamentos avaliados (Tabela 1); no entanto, SANTANA & CHAPARRO (1999) relatam que houve multiplicação de protocormos e formação de plântulas no meio de cultura quando suplementado com 100 g L⁻¹ de polpa de banana verde e 120 mL L⁻¹ de suco de abacaxi para o híbrido de *Oncidium* Gower ramcey.

HUANG et al. (2001) utilizaram a formulação completa do meio MS para clonagem *in vitro* de *Paphiopedilum*, concluindo que a suplementação do meio com água de coco até a concentração de 22,5% aumentou o número de brotos, a concentração de até 15% a quantidade de raízes formadas, e a adição de 60 g L⁻¹ banana proporcionou aumento no número de brotações. Por outro lado, adições acima de 20 g L⁻¹ de banana provocou uma diminuição do número de raízes, fato que não foi observado para o híbrido de *Cattleya* testado neste trabalho, uma vez que os tratamentos suplementados com 50 e 100 g L⁻¹ de polpa de banana apresentaram mé-

dias superiores de número de raízes em relação à testemunha.

Os resultados de aclimatização, apresentados na Figura 1, evidenciam que as plântulas provenientes dos tratamentos T3, T5 e T6,

com maior crescimento, apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto as mudas obtidas dos tratamentos T1, T2 e T4 apresentaram de 80 a 85% de sobrevivência.

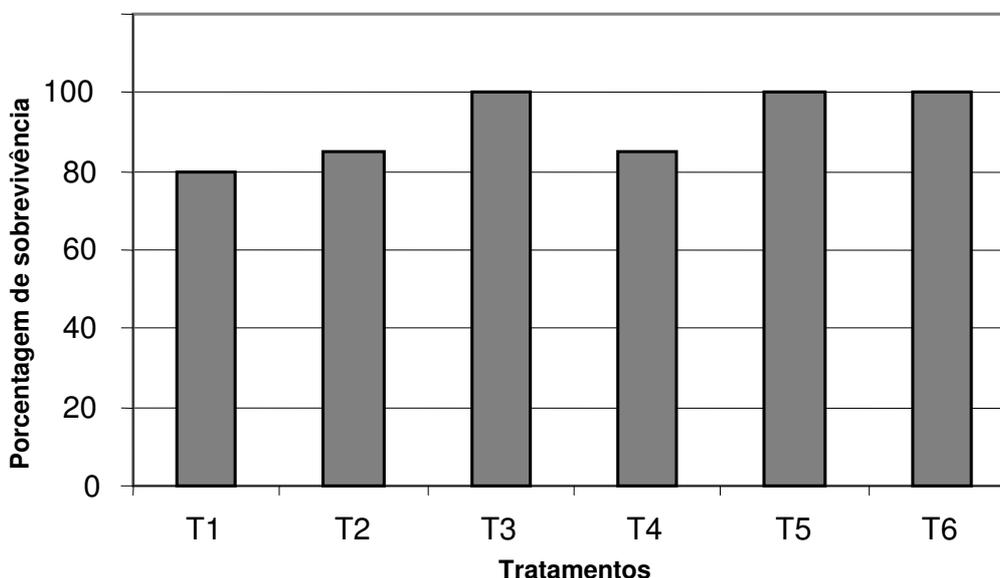


Figura 1. Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *C. labiata* X *C. forbesii* após seis meses de aclimatização. *Survival (%) of C. labiata x C. forbesii seedlings 6 months after acclimatization*
 Legenda: T1: testemunha; T2: 50 g L⁻¹ banana; T3: 100 g L⁻¹ banana; T4: 50 mL L⁻¹ água de coco; T5: 50 g L⁻¹ de banana + 100 mL L⁻¹ água de coco; T6: 100 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ água de coco.
Legend : T1 : check treatment. T2 : 50 g L⁻¹ banana. T3 : 100 g L⁻¹ banana. T4 : 50 mL L⁻¹ coconut water. T5 : 50 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ coconut water. T6 : 100 g L⁻¹ banana + 100 mL L⁻¹ coconut water.

VIDOZ et al. (1999), em estudos com as orquídeas *Brassavola perrinii* e *Cattleya forbesii* X *Brassavola perrinii*, testaram o desenvolvimento das plântulas em meio MS e meio com solução salina do fertilizante Hyponex de formulação (6:5:19) e 20 g L⁻¹ de polpa de banana. Estes autores constataram que o meio MS foi superior no desenvolvimento *in vitro* das plântulas; porém, durante a fase de aclimatização, houve melhor sobrevivência das plântulas que foram cultivadas em meio de Hyponex com adição de polpa de banana.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, com exceção ao número de brotações, a suplementação do meio de cultura com polpa de banana (T3) ou polpa de banana + água de coco (T5 e T6) produziu mudas de melhor qualidade para todos os parâmetros analisados.

Conclusão

Os melhores tratamentos para a propagação *in vitro* e aclimatização de *C. labiata* x *C. forbesii* foram o MS + 100 g L⁻¹ de polpa de

banana (T3), MS + 50 g L⁻¹ de polpa de banana + 100 mL L⁻¹ de água de coco (T5) e T6 (MS + 100 g L⁻¹ de polpa de banana + 100 mL L⁻¹ de água de coco), demonstrando a eficiência da adição da água de coco e da polpa de banana no crescimento *in vitro* de orquídeas.

Referências

ALTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O.; LIMA, F. R. R.; PITOMBO, L. M. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal.** Boletim Técnico nº 7. Fundação Pinhalense de Ensino. Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, SP. 14p. Disponível em <<http://www.creupi.br/nourau/document/get.php?i=88>> Acesso em 21 jul. 2004.

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ceres**, Viçosa, MG, v.53, n.310, p.608-613, 2006.

- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. California: A Wiley – Interscience Publication, 1992 680 p.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: Funep, 1995, 247p.
- 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: EMBRAPA - SPI/ CNPH, 1998. v.1, 864p.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.177- 181, 1984.
- DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo in vitro de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchib. f.** 2004. 30f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná.
- FARIA, R. T. Micropropagação de *Dendrobium nobile* in vitro. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas. Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.
- FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.2, n.3, p.489-492, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- HUANG, L. C.; LIN, C. J.; KUO, C. I. Paphiopedilum cloning in vitro. **Scientia Horticulturae**, Ireland, v.91, p.111-121, 2001.
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROFINSKI, L. A. (Ed). **Cultivo de tejidos em la agricultura**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991 p. 41-77.
- MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do alto da serra**. Rio de Janeiro: Salamandra. 1996, v.1, 256p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.
- NUNES, C. F.; DALILHIA, M. P.; SANTOS, N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAÚJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.
- RAPOSO, J. G. C. M. F. **A etimologia a serviço dos orquídeos**. São Paulo: Ave Maria, 1993. 308p.
- SANTANA, G. E.; CHAPARRO, K. Clonal propagation of *Oncidium* the culture of floral buds. **Acta Horticulturae**, Belgium, v.482, p.315-320, 1999.
- SEENI, S.; LATHA, P. G. In vitro multiplication and ecorehabilitation of the endangered blue Vanda. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.61, p.1-8, 2000.
- SILVA, E. F.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, A. B.; NOGUEIRA, D. A. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo in vitro de orquídea. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.1, p.8-12, 2005.
- SHIAU, Y. J.; SAGARE, A. P. L.; CHEN, U. C.; YANG, S. R.; TSAY, H.S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.43, p.123-130, 2002.
- STANCATO, G. S.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas in vitro: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.51-57, 2008.
- SHU, F. L.; SATISH, M. N.; CHAO, L. K.; CHUNG, L. C.; HSIN, S. T. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino - A medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 40, n. 5, p.528–535, 2004.
- VIDOZ, M. L.; FLACHSLAND, E. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Comportamiento ex vitro de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de três híbridos intergenéricos. In: **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. SGCyT, Corrientes, v.5. p.13 –16, 1999.
- ZORNING, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v.3, n.3, p.3-8, 1996.

Recebido em 16-04-2007

Aceito para publicação em 19-03-2009