

Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral

Donizetti Tomaz Rodrigues¹, Roberto Ferreira Novais¹, Víctor Hugo Alvarez V.¹, José Maria Moreira Dias², Wagner Campos Otoni³, Ecila Mercês de Albuquerque Villani^{4*}

RESUMO

Existem diversos meios nutritivos utilizados no cultivo *in vitro* de orquídeas, com diferentes composições e concentrações de sais, resultando em respostas distintas entre eles. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Cattleya walkeriana* Gardner) sob diferentes doses de fertilizante NPK, adicionado ao meio de cultivo, como fonte de nutrientes. Foi utilizado o fertilizante Peters[®] na formulação NPK 10-30-20 + Mg + micronutrientes, nas doses de: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 10,0 g L⁻¹ de meio, acrescido de água de coco (150 mL L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹), carvão ativado (2 g L⁻¹) e pH corrigido para 5,6. Foram utilizados frascos de vidro de 320 mL de capacidade, contendo 35 mL de meio onde foram inoculadas dez plântulas com seis meses de idade, previamente germinadas em meio Knudson C. O experimento foi mantido em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 μmol m⁻² s⁻¹. A produção máxima de matéria seca da parte aérea das plantas, aos seis meses de idade, foi estimada em 0,255 g/frasco com uso de 5,22 g L⁻¹ do fertilizante adicionado ao meio de cultura. Considerando a possibilidade de salinidade elevada do meio, para algumas espécies de orquídea, estimou-se a dose de fertilizante (3,55 g L⁻¹) necessária para obtenção de 90% da produção máxima. As raízes apresentaram drástica redução do crescimento (menor número e curtas) em condições de alta concentração de fertilizante.

Palavras-chave: fertilizante comercial, nutrição, micropropagação, Orchidaceae.

ABSTRACT

In vitro cultivation of orchid seedlings in media with different concentrations of mineral fertilizer

There are a number of medium formulations for growth of orchid seedlings *in vitro*, with different compositions and concentrations of salts, leading to varying plant responses to them. The objective of this work was to evaluate *in vitro* growth of orchid (*Cattleya walkeriana* Gardner) seedlings subjected to different rates of a NPK fertilizer added to the growth medium. The fertilizer Peters[®] was used in the formulation NPK 10-30-20+Mg+micronutrients in the rates of 0.0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; and 10.0 g L⁻¹ medium, with coconut milk (150 mL L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹) and activated charcoal (2 g L⁻¹) and pH adjusted to 5.6. Six-month-old seedlings, previously germinated in Knudson C medium were transferred to 320 mL glass jars containing 35 mL of medium, using 10 plants per jar. The maximum production of dry matter from the aerial part at six months of age was estimated at 0.255 g/jar, with the medium added of 5.22 g L⁻¹ of fertilizer. Considering the possibility of high salt concentration in the medium for some orchid species, the fertilizer rate needed to obtain 90% of maximum production was estimate at 3.55 g L⁻¹. There was a drastic growth reduction in root growth when using high fertilizer concentrations, producing fewer roots and shorter.

Key words: mineral fertilizer, nutrition, micropropagation, Orchidaceae.

Recebido para publicação em 15/09/2011 e aprovado em 27/01/2012

¹ Engenheiros-Agrônomos, Doutores. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, Av. P.H. Rolfs, s/n., CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. donitom@yahoo.com.br; rfnovais@ufv.br; vhav@ufv.br

² Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia. Av. P.H. Rolfs, s/n., CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. jmmdias@ufv.br

³ Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Av. P.H. Rolfs, s/n., CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. wotoni@ufv.br

⁴ Engenheira-Agrônoma, Doutora. Pós Doutorado, Bolsista FAPEMIG. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, Av. P.H. Rolfs, s/n., CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ecilavillani@hotmail.com (*autor correspondente)

INTRODUÇÃO

A literatura especializada mostra que não há, ainda, um meio de cultura específico e ideal quanto à composição nutricional para todos os gêneros, espécies ou híbridos de orquídeas. Entretanto, trabalhos relatam que a concentração de sais no meio de cultivo influencia diretamente o crescimento de orquídeas *in vitro*, seja pela falta, seja pelo excesso (Park *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2007; Stancato *et al.*, 2008).

Alguns autores afirmam que há especificidade muito grande entre a composição química do meio e o genótipo, em que, para cada espécie ou grupo de espécies, há um meio mais apropriado. Esse fato foi verificado por Dijk & Eck (1995) ao avaliarem diferentes concentrações de fósforo (P) e nitrogênio (N) no cultivo *in vitro* de *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) P.F. Hunt & Summerh., *D. praetermissa* (Druce) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó e *D. maculata* (L.) Soó ssp. *maculata*. Esses autores também concluíram que somente o N, em grandes doses, trouxe problemas de toxicidade, provavelmente pela salinidade causada.

Adelberg *et al.* (1997) compararam, na forma líquida, os seguintes meios: MS (Murashige & Skoog, 1962), ½ MS, ¼ MS, Knudson C (Knudson, 1946), Lindemann (Lindemann *et al.*, 1970) e Vacin & Went (Vacin & Went, 1949), e obtiveram melhores resultados na produção de matéria seca de plântulas obtidas de sementes de dois híbridos de *Cattleya* (*Sophrolaeliocattleya* Jewel Box ‘Scheherezade’ e *Brassolaeliocattleya* Rugley’s Mill ‘Mendenhall’) com o uso de MS e suas diluições.

Em cultivo *in vitro* de duas orquídeas terrestres (*Bromheadia finlaysonia* Rchb. f. e *Cymbidium sinense* (Jacks. ex Andrews) Willd.) e uma epífita (*Dendrobium* “White Fairy”), avaliou-se a absorção de nitrato e amônio (Hew *et al.*, 1993). Os autores não observaram diferenças significativas nos padrões de absorção de N entre as espécies estudadas, embora a taxa de absorção de amônio tenha sido maior do que a de nitrato.

A nutrição nitrogenada de cultivo *in vitro* também foi estudada por Majerowicz & Kerbauy (2002); nesse estudo, foram utilizadas diferentes fontes de N: NO_3^- , NH_4^+ , ureia, e glutamina, para o cultivo de plântulas de dois genótipos de *Catasetum fimbriatum* (Gardner ex Hook.) Rchb. f. Esses autores verificaram melhores respostas à glutamina em termos de produção de matéria seca das plântulas, sendo que não houve diferença significativa entre as outras fontes. Também, a presença do nitrato causou maior crescimento de raízes em um dos genótipos, contrariamente ao ocorrido com a ureia. Por outro lado, no outro genótipo observaram restrição do crescimento da parte aérea das plantas quando a fonte amoniacal foi utilizada.

A exaustão de nutrientes no meio de cultivo faz com que as plantas cultivadas *in vitro* tenham, com o passar do tempo, taxas de crescimento reduzidas. Kishi & Tagaki (1997), estudando a exaustão de nutrientes no meio de cultivo para *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. e *Darwinara* ‘Pretty Girl’, verificaram aumento de matéria seca dos tecidos em 10 e 13 vezes, respectivamente, em relação ao início do experimento. O P foi todo absorvido por *D. moniliforme*, ocorrendo o mesmo para S, sacarose, e com decréscimo no valor de pH de 5,8 para 5,0. Resultados semelhantes foram observados para *Darwinara* “Pretty Girl”, exceto para o P que não foi totalmente absorvido. Com esse trabalho, os autores constataram que as diferenças nos padrões de absorção de NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , glicose, frutose, sorbitol e manitol, e também nos padrões de produção de matéria seca são oriundas da carga genética e dos métodos de propagação *in vitro*.

Com este trabalho, avaliou-se a produção *in vitro* de matéria seca de plântulas de orquídeas, com seis meses de idade, em resposta a doses crescentes do fertilizante Peters® 10-30-20 + Mg + micronutrientes, adicionadas ao meio de cultura, como fonte de nutrientes minerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa. As condições da sala de crescimento foram mantidas constantes a 27 ± 2 °C, com 16/8 h luz/escuro e irradiância de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes Osram®, 40 W luz do dia.

A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 320 mL com 35 mL de meio sobre o qual foram colocadas cinco plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner, provenientes de sementes, com aproximadamente 0,5 cm de altura e 0,2 cm de comprimento radicular, cultivadas inicialmente em meio Knudson C (Knudson, 1946) durante seis meses. Quando repicadas para os frascos com o respectivo tratamento, estas foram separadas individualmente e limpas do ágar aderido às raízes.

O experimento, em blocos ao acaso com quatro repetições, foi constituído por sete concentrações do fertilizante Peters®: NPK 10-30-20 + Mg + micronutrientes (em g kg^{-1} , N 100; P 130,9; K 166,0; Mg 0,6 e, em mg kg^{-1} , B 68; Fe 500; Zn 25; Cu 36; Mn 250; e Mo 9) adicionado ao meio nas concentrações: 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 g L^{-1} . Em todos os tratamentos, foram utilizados 30 g L^{-1} de sacarose, 2 g L^{-1} de carvão ativado, 6 g L^{-1} de ágar (Merck®, Alemanha) e pH corrigido para 5,6.

Ao final de seis meses, foram avaliados o crescimento das plantas quanto à produção de matéria fresca e seca de

parte aérea e de raízes, comprimento e número de raízes, altura e número de unidades de parte aérea (UPA, constituída pela estrutura formada pelo limbo foliar + pseudobulbo), utilizando-se de paquímetro digital (Digimess 100A) e balança analítica (Gehaka BG 400).

As amostras foliares foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, moídas e submetidas à digestão nítrico-perclórica para a determinação dos teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, B e Zn, quantificados por espectrometria de emissão óptica em plasma induzido (ICP), e N pelo método semi-micro-Kjeldahl (Embrapa, 1999).

As análises de variância, de regressão e contrastes foram realizadas com auxílio do programa SAEG 9.0, ajustando-se as equações para as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de raízes (MSR), 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) e os teores de nutrientes na parte aérea da planta, como variáveis das doses do fertilizante no meio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em experimento anterior, doses de fertilizantes minerais compreendidas entre 0,25 e 2,25 g L⁻¹ resultaram, para muitas variáveis de crescimento, em curvas lineares, não sendo possível definir a melhor dose de fertilizante a ser adicionada ao meio de cultivo (Rodrigues *et al.*, 2012). Com base nesses resultados, foram estabelecidas as doses para este experimento. Acreditava-se que, em concentrações a partir de 3 a 4 g L⁻¹ do fertilizante, a salinidade começasse a exercer efeito prejudicial ao crescimento e desenvolvimento das plântulas (explantos).

As diferenças encontradas na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) como variável das doses foram descritas por uma equação quadrática (Figura 1A), que permitiu estimar a concentração de fertilizante (5,22 g L⁻¹) necessária para atingir a produção máxima de MSPA (0,255 g/frasco). Considerando-se 90% da produtividade máxima, a concentração de fertilizante no meio é de 3,55 g L⁻¹.

A produção de matéria seca de raízes (MSR) apresentou alto incremento até a dose de 1 g L⁻¹ de fertilizante; e, como observado no modelo, apresentou um intervalo entre as doses de 1 a 5 g L⁻¹, com pequenas variações na produção de matéria seca (Figura 1B). De acordo com esse resultado, verificou-se que a relação entre a produção de MS de raiz e de parte aérea (RA/PA) (Figura 1C) foi fortemente influenciada pela concentração de sais no meio, tendo em vista o aumento da MSPA acompanhado pela diminuição na MSR. Orquídeas cultivadas *in vitro* podem apresentar relação RA/PA superior a dois, dependendo do meio usado e da espécie (Rego-Oliveira & Faria, 2005; Stancato *et al.*, 2008), o que não ocorre com plantas *ex*

vitro que apresentam, de modo geral, relação menor que 1, como observado por Rodrigues *et al.* (2010) ao avaliarem o crescimento de *Laelia purpurata* 'Werkhaser' x *Laelia lobata* 'Jeni' cultivadas em vasos, em casa de vegetação. No presente estudo, a relação RA/PA na condição da dose correspondente à produção máxima de MSPA foi de 1,85 (Figura 1C). Desta forma, a relação RA/PA pode ser utilizada como característica auxiliar ao estudo nutricional, sabendo-se que valores extremos de RA/PA podem indicar problemas relativos à deficiência ou ao excesso de nutrientes.

O número de unidades de parte aérea (UPA) e o comprimento médio dessas unidades (CMUPA) (Figuras 1D e 1E) apresentaram alto incremento em resposta ao aumento da dose do fertilizante, com valores máximos estimados em 14,7 unidades/frasco e 2,6 cm por UPA, nas concentrações de 3,7 e 4,8 g L⁻¹, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes *et al.* (2009) ao avaliarem o crescimento de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. em meio de cultura MS (50% da concentração original) e em dois meios contendo os fertilizantes: Hyponex (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja (NPK 6-12-36), durante o período de 180 dias de cultivo *in vitro*.

As raízes demonstraram sensibilidade à salinidade quando expostas às maiores concentrações (acima de 6 g L⁻¹ do fertilizante), com reduzido número (Figura 1F) e comprimento (Figura 1G). As orquídeas, as epífitas em particular, têm as raízes com velame, estrutura que estoca água e nutrientes, disponibilizando-os de maneira lenta e gradual para a planta em seu habitat (Arditti, 1992). Assim, pode-se deduzir que o suprimento de nutrientes deve ser em baixas concentrações e mais continuamente, ao contrário do que se faz para as culturas anuais: grandes doses em poucas aplicações (Novais & Rodrigues, 2004). Portanto, a adição de 10 g L⁻¹ de fertilizante Peters® 10-30-20 + Mg + micronutrientes resultou em perdas para todas as variáveis biométricas analisadas.

As plantas, de modo geral, apresentaram aspecto saudável e sem sintomas de estresse salino nos tratamentos que receberam até 5 g L⁻¹ do fertilizante. No entanto, no tratamento com a dose de 10 g L⁻¹, as plantas manifestaram o fenômeno da hiper-hidricidade, definida como uma desordem morfofisiológica de plantas crescidas *in vitro*, resultando em baixa habilidade para o crescimento normal, além de problemas relativos à aclimatização. Este fenômeno é uma resposta da planta a estresses gerados por um ambiente inadequado ou impróprio para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*, caracterizado por redução no teor de clorofila e proteínas, incremento no conteúdo de água e alteração na composição iônica dos tecidos (Hazarika, 2006; Hossain *et al.*, 2010).

Não existe na literatura dados sobre os níveis críticos de macro e micronutrientes para plantas de orquídeas

cultivadas *in vitro*. Para uma comparação entre os tratamentos, serão considerados adequados os teores de macro e micronutrientes encontrados para a produção máxima de MSPA e para 90% desta produção.

Teores adequados de N em folhas de plantas adultas apresentam valores entre 16 e 35 g kg⁻¹ (Jones Jr. *et al.*, 1991). Considerando que o teor adequado de N em cultivos *in vitro* seja aquele em que ocorre a produção máxima (28,3 g kg⁻¹ de N) e comparando este com o teor apresentado para a última dose de fertilizante (51,8 g kg⁻¹), percebe-se alto incremento de N nos tecidos da planta (Figura 2A), sendo este um fator indicativo de hiper-hidricidade.

Nas raízes e na parte aérea das plantas, foram observados teores muito elevados de P (Figura 2B) quando comparados com aqueles considerados adequados para plantas adultas (Jones Jr. *et al.*, 1991). Isso se deve, em parte, à grande disponibilidade deste nutriente no meio de cultura, uma vez que o fertilizante utilizado apresentava na sua formulação teor elevado de P (130,9 g kg⁻¹). Estes teores elevados de P sugerem que plantas jovens de orquídeas tenham comportamento semelhante a ou-

tras plantas perenes, sendo muito responsivas ao P nesta fase inicial de crescimento.

Os teores de K na parte aérea variaram segundo um modelo (raiz quadrada), com valores entre 16,9 e 39,0 g kg⁻¹, em que os maiores teores foram observados entre as doses de 5 e 10 g L⁻¹ de fertilizante no meio (Figura 2C). Plantas cultivadas *in vitro* têm, inicialmente, comportamento heterotrófico, isso porque a fotossíntese realizada pelas folhas não produz carboidratos suficientes para crescimento satisfatório. Por isso, há necessidade da adição de fontes externas de carboidratos ao meio, os quais serão absorvidos e utilizados pela planta (Arditti, 1992; George, 1993). Essa relação entre o transporte de açúcares e o K sugere que plantas cultivadas *in vitro* sejam muito mais sensíveis à deficiência deste nutriente no meio. Diversos trabalhos mostram que não apenas a dose de K interfere no crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, mas também a fonte usada, uma vez que o K entra como íon acompanhante de nitrato, cloreto ou sulfato (Caldas *et al.*, 1998; Junqueira *et al.*, 2003; Villa *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008).

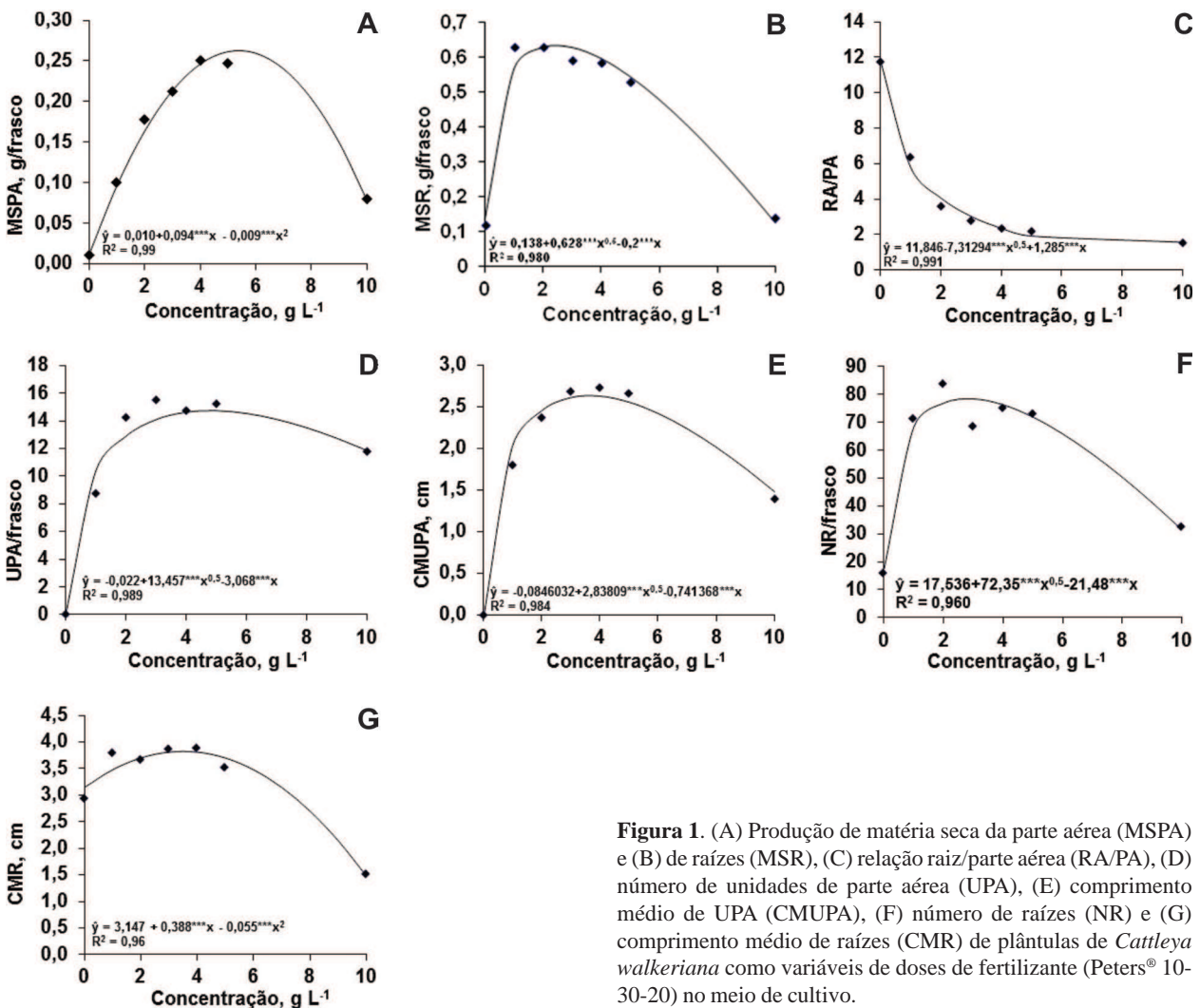


Figura 1. (A) Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e (B) de raízes (MSR), (C) relação raiz/parte aérea (RA/PA), (D) número de unidades de parte aérea (UPA), (E) comprimento médio de UPA (CMUPA), (F) número de raízes (NR) e (G) comprimento médio de raízes (CMR) de plântulas de *Cattleya walkeriana* como variáveis de doses de fertilizante (Peters® 10-30-20) no meio de cultivo.

Como o fertilizante Peters® 10-30-20 foi utilizado neste experimento, o meio apresentava baixa concentração em Ca, confirmado pelos baixos teores encontrados na parte aérea (Figura 2D), inferiores aos considerados adequados por Jones Jr. *et al.* (1991), de 5 a 20 g kg⁻¹. Entretanto, sintomas visuais de deficiência deste nutriente não foram observados. Provavelmente, a necessidade de Ca foi suprida, em parte, pela água de coco adicionada ao meio, sendo que o teor de Ca apresentou uma diluição linear nos tecidos da planta com o aumento da produção de matéria seca, com valores de 5,5 para 1,81 g kg⁻¹, respectivamente para a dose de 1 a 10 g L⁻¹ do fertilizante.

Água de coco, muito utilizada na propagação *in vitro* de orquídeas, quando adicionada ao meio de cultura pode induzir a divisão celular e promover um rápido crescimento de plantas, em decorrência de sua composição (sais minerais, açúcares, reguladores de crescimento, proteínas, além de vitaminas e outros componentes orgânicos) (George, 1993). Araújo *et al.* (2006) verificaram maior desenvolvimento de plântulas de *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba' cultivadas *in vitro* com a adição de 200 mL de água de coco ao meio Knudson C.

Com relação ao teor de Mg na parte aérea, este apresentou expressivo aumento a partir de 2 g L⁻¹ de fertilizante (de 0,92 a 1,81 g kg⁻¹), ainda assim, insuficientes para o adequado crescimento de *Cattleya* de 2 a 3 g kg⁻¹ (Jones Jr. *et al.*, 1991) (Figura 2E).

Os teores de S aumentaram, significativamente, com o aumento da dose de fertilizante no meio de cultivo, de 1,04 a 3,5 g kg⁻¹ (Figura 2F), sendo este comportamento inesperado, uma vez que o fertilizante Peters® 10-30-20 não apresenta S em suas garantias mínimas de nutrientes, levando a crer que um pequeno teor, não considerado pelo fabricante, está presente no fertilizante e na água de coco.

No Brasil, o setor produtivo de flores e plantas ornamentais vem ocupando espaço no setor do Agronegócio o que tem estimulado muito os produtores. Todavia, é um setor ainda carente de pesquisas, principalmente no que diz respeito às técnicas que promovam melhorias na qualidade do produto (folhas e flores). Furlani & Castro (2001) enfatizam que o balanço adequado de micronutrientes é fundamental uma vez que estes estão diretamente relacionados com a formação dos botões florais e, sua deficiência ou, seu excesso, pode causar alterações no aspecto de folhas e flores.

No presente trabalho, dos micronutrientes analisados, apenas os teores de Zn e Mn mostraram-se adequados, semelhantes àqueles encontrados em plantas adultas (Figuras 3B e C) (Jones Jr. *et al.*, 1991; Arditti, 1992; Novais & Rodrigues, 2004). Isso demonstra que os teores de Zn e Mn no fertilizante Peters® e na água de coco foram suficientes para suprir as necessidades das plantas.

Os teores de Fe encontrados nos tecidos da parte aérea da espécie estudada foram baixos, indicando que os sintomas visuais de deficiência deste nutriente, frequentemente observados em cultivos *in vitro*, são devidos à

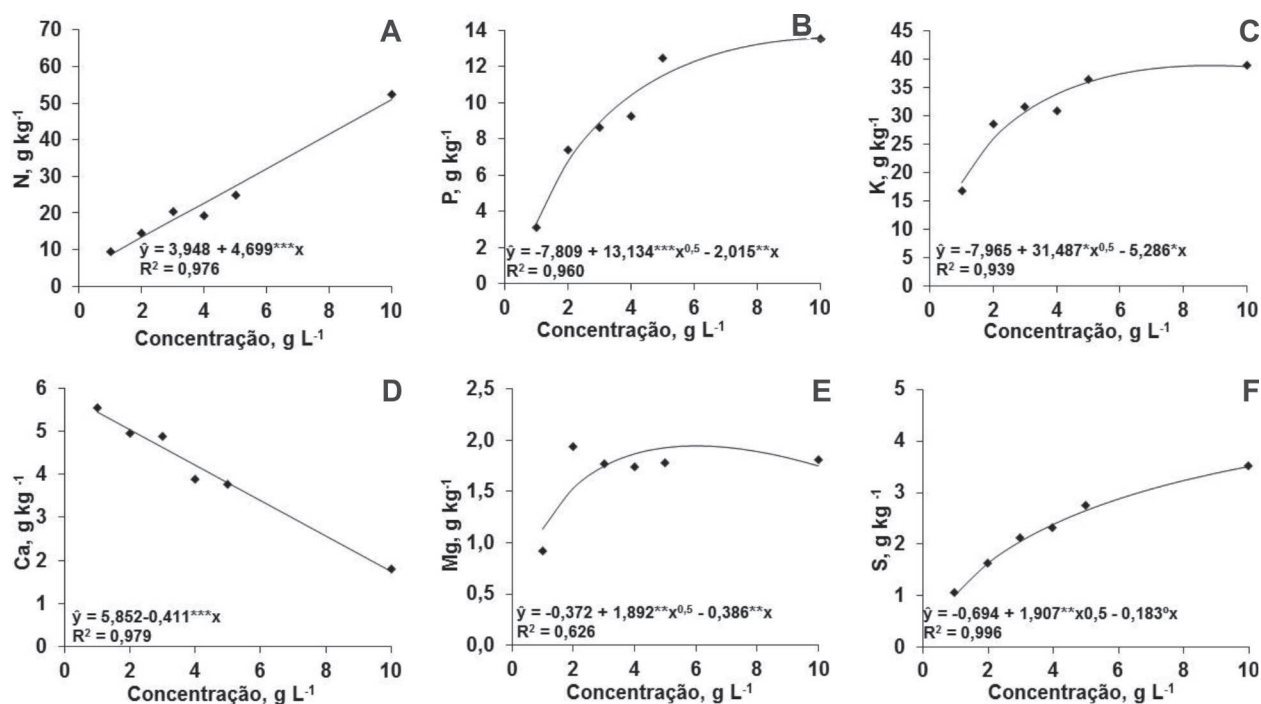


Figura 2. Teores de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio(C), cálcio (D), magnésio (E) e enxofre (F) na parte aérea de plântulas de *Cattleya walkeriana* como variáveis de doses de fertilizante (Peters® 10-30-20) no meio de cultivo.

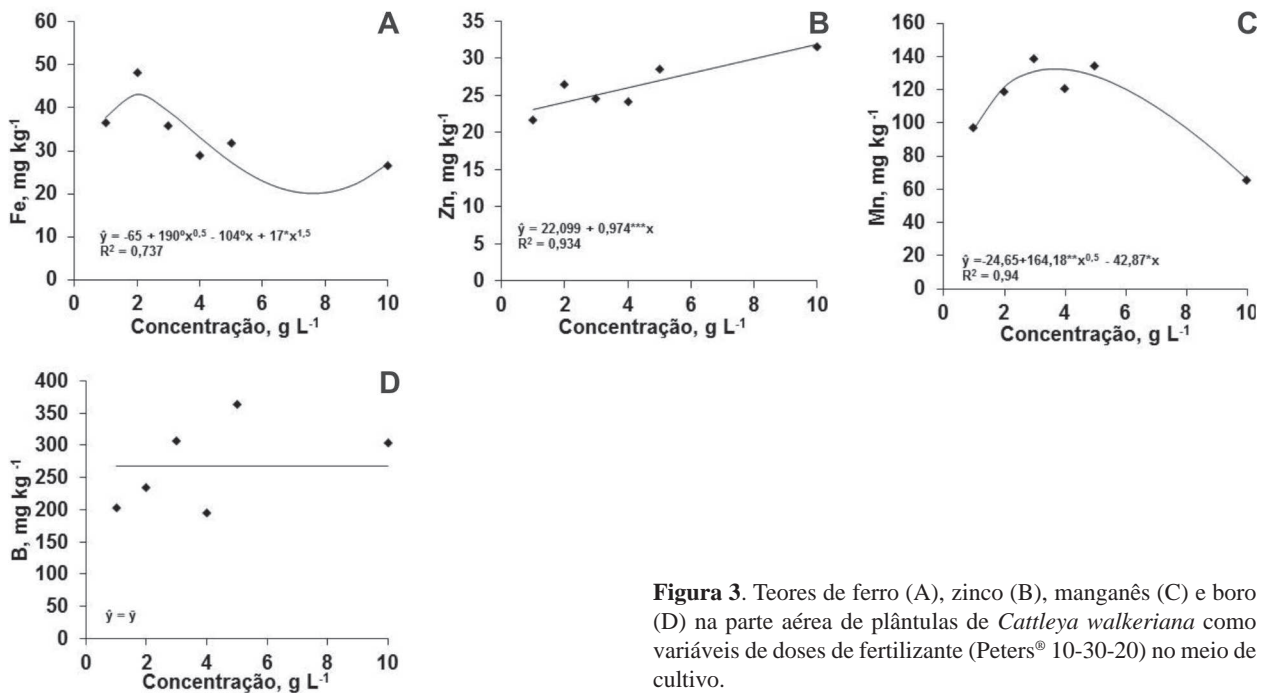


Figura 3. Teores de ferro (A), zinco (B), manganês (C) e boro (D) na parte aérea de plântulas de *Cattleya walkeriana* como variáveis de doses de fertilizante (Peters® 10-30-20) no meio de cultivo.

restrição deste nutriente no meio (Figura 3A), ou pelos elevados teores de P nos tecidos (Figura 2B). Em outros experimentos realizados *in vitro*, sintomas de provável deficiência de Fe foram observados em plantas cultivadas em altas concentrações de P (Rodrigues *et al.*, 2010), sendo esses mais acentuados em meios com concentrações muito baixas de Fe. Vários autores relatam que altos teores de P no solo e na planta podem ser considerados como principais fatores que contribuem para o surgimento de deficiência de Fe (Hue *et al.*, 1988; Koseoglu, 1995; Furlani & Castro, 2001; Marrocos *et al.*, 2003).

Teores elevados de B foram encontrados na parte aérea de plantas (Figura 3D), sem diferenças estatísticas entre tratamentos. Apesar de estes teores serem bastante elevados, não foram observados problemas de toxidez causada pelo B. O principal sintoma descrito para a toxicidade de B é clorose, seguida pela necrose em margens e ápices foliares (Nable *et al.*, 1997). Sintoma semelhante a este foi observado em alguns frascos; no entanto, este não seguiu nenhuma relação entre os tratamentos que pudesse levar à certeza quanto a este sintoma.

CONCLUSÕES

A produtividade máxima de matéria seca de parte aérea das mudas foi obtida com 5,22 g L⁻¹ do fertilizante Peters® 10-30-20.

A relação raiz/parte aérea decresceu com o aumento da dose de fertilizante no meio.

Altas concentrações (10 g L⁻¹) de sais no meio geram prejuízos ao crescimento de plantas de orquídeas *in vitro*.

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 Mecê de Albuquerque Villani.

REFERÊNCIAS

- Adelberg JW, Desamero NV, Hale SA & Young E (1997) Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48:1-7.
- Araújo AG, Pasqual M, Villa F & Costa FC (2006) Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. *Revista Ceres*, 53:608-613.
- Arditti J (1992) *Fundamentals of orchid biology*. New York, John Wiley & Sons. 691p.
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. p.87-132.
- Dijk B & Eck N (1995) Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. *New Phytologist*, 131:353-359.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (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.
- Figueiredo MA, Santos FMS, Silva JOC, Costa FHS & Pasqual M (2007) Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. *Revista Brasileira de Biociências*, 5:294-296.

- Furlani AMC & Castro CEF (2001) Plantas ornamentais e flores. In: Ferreira ME, Cruz MCP, van Rija B & Abreu CA (Eds.) Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura Jaboticabal, CNPq/FAPESP/POTAFOS, Editora Legis Summa Ltda. p.533-552.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1 - The Technology. 2ª ed. England, Exegetics Ltd. 786p.
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105-120.
- Hew CS, Lim LY & Low CM (1993) Nitrogen uptake by tropical orchids. *Environmental and Experimental Botany*, 33:273-281.
- Hossain MM, Sharma M, Silva JAT & Pathak P (2010) Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123:479-487.
- Hue NV, Fox RL & McCall WW (1988) Chlorosis in macadamia as affected by phosphate fertilization and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 11:161-173.
- Jones Jr JB, Wolf B & Mills HA (1991) Plant analysis handbook. Athens, Micro-Macro Publishing, Inc. 213p.
- Junqueira KP, Rodrigues VA, Santos FC & Pasqual M (2003) Crescimento *in vitro* de crisântemo: efeito do nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de potássio (KCl). In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais; 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, UFLA/FAEPE. p.197.
- Kishi F & Tagaki K (1997) Analysis of medium components used for orchid tissue culture. *Lindleyana*, 12:158-161.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14:214-217.
- Koseoglu AT (1995) Effect of iron chlorosis on mineral composition of peach leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 18:765-776.
- Lindemann EGP, Gunckel JE & Davidson OW (1970) Meristem culture of *Cattleya*. *American Orchid Society Bulletin*, 39:100-127.
- Majerowicz N & Kerbauf 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.
- Marrocos PCL, Martinez HEP, Alvarez V. VH, Bruckner CH & Cantarutti RB (2003) Interação P x Fe em mudas de macadâmia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25:323-325.
- Moraes CP, Diogo JA, Pedro NP, Canabrava RI, Martini GA & Marteline MA (2009) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências*, 7:67-69.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Nable RO, Bañuelos GS & Paull JG (1997) Boron toxicity. *Plant and Soil*, 198:181-198.
- 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 SW, Jeon JH, Kim HS, Parky M, Aswath C & Joung H (2004) Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Science Horticulturae*, 99:199-205.
- 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 & Villani EMA (2010) Orchid growth and nutrition in response to mineral and organic fertilizers. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34:1609-1616.
- Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez V. VH, Dias JMM & Villani EMA (2012) Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. *Revista Ceres* 59:1-8
- Stancato GC, Abreu MF & Furlani AMC (2008) Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia*, 67:51-57.
- Vacin EF & Went FW (1949) Some pH changes in mineral solution. *Botanical Gazette*, 110:605-113.
- Villa F, Pasqual M, Pio LAS, Teodoro GS & Miyata LY (2006) Efeito do cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Cherokee. *Revista Ceres*, 53:224-227.