

Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras

Larissa Abgariani Colombo, Ricardo Tadeu de Faria*, Jane Fiuza Rodrigues Portela de Carvalho, Adriane Marinho de Assis e Inês Cristina de Batista Fonseca

Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, C. P. 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: faria@uel.br

RESUMO. A incorporação de fungicidas vem sendo utilizada nos meios de cultura, apresentando efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* das orquídeas brasileiras *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*. As plântulas de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii* foram inoculadas no meio de cultura MS, suplementado com diferentes doses do fungicida clorotalonil: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 g L⁻¹. Após 180 dias do início do experimento, foram avaliadas as variáveis: número de brotações, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da parte aérea e peso fresco. Trinta dias após o transplante das plântulas, foi avaliada a proporção de pegamento. As doses do fungicida que melhor influenciaram a propagação *in vitro* para ambas as espécies encontram-se no intervalo de 0,1 a 0,2 g L⁻¹. Em relação à proporção de pegamento das plântulas durante a fase de aclimatização, as melhores doses foram: 0,2 g L⁻¹, para a espécie *C. loddigesii*, e 0,1 g L⁻¹, para *L. lundii*.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultivo *in vitro*, *Cattleya loddigesii*, *Laelia lundii*.

ABSTRACT. The influence of the fungicide chlorothalonil on the vegetative and root development *in vitro* of two Brazilian orchid species. The incorporation of fungicides in culture means has presented positive results in the multiplication of plants cultivated *in vitro* and *in vivo*. The objective of this work was to evaluate the influence of the fungicide chlorothalonil on the vegetative and root *in vitro* development of the Brazilian orchids *Cattleya loddigesii* and *Laelia lundii*. *Cattleya loddigesii* and *Laelia lundii* seedlings were inoculated in an MS mean and supplemented with different doses of chlorothalonil fungicide: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 g L⁻¹. The following variables were evaluated 180 days after the beginning of the experiment: number of shoots, longest root length, aerial part height and fresh weight. Thirty days after seedling, germination/sticking proportion was evaluated. Fungicide dose with the strongest influence on the *in vitro* fertilization of both species were those within the 0,1 to 0,2 g L⁻¹ intervals. As for seedling germination during the acclimatization phase, the dosages with the strongest effect were 0,2 g L⁻¹ for the *C. loddigesii* and 0,1 g L⁻¹ for the *L. lundii*.

Key words: Orchidaceae, *in vitro* cultive, *Cattleya loddigesii*, *Laelia lundii*.

Introdução

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, mas muitas estão correndo o risco de extinção, devido à destruição de seu *habitat* e às coletas predatórias. As espécies *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii* são nativas do Brasil e são epífitas, possuindo raízes aéreas (Silva, 1976).

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil, há pouco mais de 25 anos, para aumentar, principalmente, a produção de

mudas de alta qualidade genética e, conseqüentemente, reduzir o seu custo. Além disso, tem contribuído para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (Stancato *et al.*, 2001).

A propagação *in vitro* de plantas de importância econômica, em larga escala, tem resultado na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseadas no princípio da linha de produção. Particularmente na área de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas (gérbera, cravo, tulipa, orquídea), a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas tem permitido a compatibilização de

demandas específicas do mercado interno e externo com atributos importantes como: época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores por planta, tamanho e vigor das plantas (Kerbaui, 1997), além da garantia da qualidade e da homogeneidade do produto final (Stancato et al., 2001).

Um dos maiores problemas da produção industrial de mudas é a porcentagem de contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias oportunistas durante as etapas de propagação *in vitro*. É difícil obter informação sobre perdas devido à contaminação, mas as biofábricas de plantas reconhecem a seriedade do problema (Wright et al., 1986). As contaminações por fungos e bactérias podem causar perdas econômicas para o micropropagador, infestando o material vegetal (explante) ou infestando o meio de cultura (Long et al., 1988). Leifert et al. (1994) observaram que em laboratórios da Alemanha, da Inglaterra e da Holanda, do total das contaminações, as perdas causadas por fungos foram de 10-35%. Em biofábricas brasileiras, segundo Oliveira et al. (2000), já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30%, causadas tanto por fungos como por bactérias, mesmo com todos os cuidados de assepsia.

Diversas formulações de meios básicos, assim como diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos, têm sido utilizadas nos meios de cultura, visando a adequá-los às necessidades de cada espécie vegetal para seu cultivo *in vitro*. A adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônio nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz, estimulando respostas como crescimento e alongamento, enraizamento ou multiplicação da parte aérea (Grattapaglia e Machado, 1990).

De acordo com Giladi et al. (1979), os fungicidas e bactericidas incorporados ao meio de cultura para minimizar os problemas de contaminação têm apresentado efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* das orquídeas brasileiras *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Estadual de Londrina

(UEL), Estado do Paraná. As orquídeas utilizadas foram *Cattleya loddigesii* Lindley. e *Laelia lundii* Rchb.f., ambas nativas do Brasil. As cápsulas dessas plantas, contendo as sementes maduras, foram coletadas nove meses após a realização da polinização artificial.

As sementes foram germinadas *in vitro* no meio MS (Murashige e Skoog, 1962), modificado com metade da concentração dos macronutrientes e acrescido de 1g L⁻¹ de carvão ativo, 30g L⁻¹ de sacarose e 7g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 6,4±0,1, antes da autoclavagem do meio. Nove meses após a realização da semeadura, as plântulas com altura da parte aérea de 1,0±0,2cm foram selecionadas para a realização do experimento.

A composição do meio de cultura utilizado na propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii* foi a mesma usada para a germinação. As concentrações do fungicida clorotalonil (g L⁻¹), adicionadas ao meio de cultura, foram: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,4±0,1, antes da adição do ágar. Posteriormente, as culturas foram transferidas para sala de crescimento com 2.000 lux de luminosidade, fotoperíodo de 16 horas-luz e temperatura de aproximadamente 25±2 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento para cada uma das espécies. Foram inoculadas 10 plântulas por repetição, totalizando 50 plântulas por tratamento. Aos 180 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotações, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da parte aérea, peso fresco. Os dados foram submetidos à análise de variância, complementada pelo teste de médias de Tukey a 5% e Regressão Polinomial, segundo Banzatto e Kronka (1995). Após realizadas essas avaliações, as plântulas foram transplantadas em vasos de cerâmica contendo esfagno como substrato e mantidas num viveiro protegido com tela de polipropileno de coloração preta, com retenção de 50% do fluxo de radiação solar, localizado a 23° 23' de Latitude Sul, 51° 11' de Longitude Oeste e Altitude média de 566m. Foram feitas regas diárias, por meio de aspersão, para manter o ambiente favorável à aclimatização das plântulas. Transcorridos trinta dias após o plantio, foi realizada a avaliação da proporção de pegamento dessas mudas por meio do teste Qui-quadrado (χ^2), para várias proporções a 5% de significância, segundo Ayres et al. (2000).

Resultados e discussão

Na Tabela 1, encontram-se os resultados da influência das diferentes doses do fungicida

clorotalonil sobre as variáveis: número de brotações, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da parte aérea e peso fresco, para as plântulas de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*.

Tabela 1. Médias referentes ao número de brotações, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da parte aérea e peso fresco, para as diferentes doses do fungicida clorotalonil, aos 180 dias após o cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*.

Orquídeas	Dose de clorotalonil (g L ⁻¹)	Número de brotações	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Altura da parte aérea (cm)	Peso fresco (g)
<i>Cattleya loddigesii</i>	0	0,97 A ¹	1,45 B	0,82 B	1,29 B	0,06 B
	0,1	1,10 A	4,38 A	1,88 A	1,89 A	0,17 A
	0,2	1,30 A	5,02 A	1,82 A	2,14 A	0,21 A
	0,4	0,94 A	2,06 B	0,84 B	1,02 B	0,02 B
	0,6	1,06 A	1,86 B	0,85 B	0,91 B	0,02 B
	CV (%)	24,82	24,93	21,39	18,09	36,97
<i>Laelia lundii</i>	0	1,40 A ¹	1,23 B	0,11 B	1,64 C	0,12 B
	0,1	1,26 A	4,10 A	2,13 A	2,43 A	0,20 A
	0,2	1,14 A	4,96 A	1,93 A	2,21 AB	0,20 A
	0,4	1,22 A	5,12 A	1,52 A	1,86 CB	0,16 AB
	0,6	1,42 A	4,90 A	1,40 A	1,81 CB	0,17 AB
	CV (%)	31,92	19,20	26,03	10,34	22,81

¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para o número de brotações, não foram verificados efeitos positivos das diferentes doses do fungicida clorotalonil, após 180 dias do início do experimento, para as duas espécies de orquídeas estudadas (Tabela 1). Ramos *et al.* (1996), utilizando o fungicida benomil em uma espécie de *Citrus*, que é uma planta de metabolismo C₃, observaram que à medida que a dosagem do fungicida era aumentada, o número de brotações foi reduzido. Yang (1976), trabalhando com *Asparagus officinalis*, concluiu que o fungicida benomil possuía algumas propriedades reguladoras de crescimento, comumente não observadas, que, segundo Thomas (1973), possivelmente, deve-se à sua semelhança estrutural com as próprias citocininas, que são um grupo de reguladores de crescimento.

Considerando as variáveis: número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da parte aérea e peso fresco, fica evidente que a dosagem ideal do fungicida clorotalonil, para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*, encontra-se no intervalo de 0,1 a 0,2g L⁻¹. A partir dessas concentrações, ocorreu a acentuada redução da resposta das referidas variáveis avaliadas (Figuras 1 e 3). Pela análise da regressão, pudemos constatar que, para o número de raízes/planta, comprimento da maior raiz/planta, altura da parte aérea/planta e peso fresco/planta, as melhores dosagens de clorotalonil foram 0,16g L⁻¹; 0,15g L⁻¹; 0,15g L⁻¹ e 0,15g L⁻¹, respectivamente, as quais fornecem, com base nas equações, as melhores respostas de crescimento, considerando cada variável avaliada (4,99 raízes; 1,94cm; 2,09cm e 0,21g, respectivamente).

As dosagens mais altas do fungicida (0,4 e 0,6g L⁻¹) causaram efeito negativo, reduzindo o desenvolvimento das plântulas de *Cattleya loddigesii* e de *Laelia lundii* (Figura 3 e 4); no entanto, nas doses 0,1 e 0,2g L⁻¹, para as duas espécies, ocorreu efeito positivo no crescimento da parte aérea e no enraizamento das plântulas, quando comparados com os de Faria *et al.* (2001), que constataram que em plântulas de *Oncidium varicosum*, uma outra espécie de orquídea, o fungicida clorotalonil não causou sintomas de fitotoxicidade nas dosagens de 0,1 e 0,2g L⁻¹, propiciando também a proliferação de protocormos. Por outro lado, numa espécie de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), planta de metabolismo C₃, Watt *et al.* (1996) verificaram que a adição de benomil e de clorotalonil, na dose 0,5g L⁻¹, inibiram a cultura de explantes da referida espécie. Esses autores transferiram os explantes para as fases de alongamento e de enraizamento, ambas livres de fungicidas, e concluíram que, após cinco semanas, o efeito negativo ainda era observado. A altura dos explantes tratados previamente com benomil e com clorotalonil foi significativamente inferior, quando comparada com a do controle, e o desenvolvimento *in vitro* das plântulas também foi inibido. A utilização de fungicidas e de bactericidas em altas concentrações tem apresentado respostas semelhantes em espécies de orquídeas, que, em relação ao seu metabolismo, são plantas do grupo CAM. Brown *et al.* (1982) concluíram que a adição de 0,05g L⁻¹ do fungicida benomil impediu a germinação de *Laelia tenebrosa*, *Vanda tricolor* e *Cattleya elongata*, e, nesta última, ao adicionar o bactericida Penicilina G, na dose 0,1g L⁻¹, o efeito foi similar. No entanto, combinações de fungicidas e de bactericidas testadas em relação ao desenvolvimento foliar e radicular obtiveram êxito, como é o caso da espécie *Brassavola nodosa*, que teve o desenvolvimento acelerado das raízes e das folhas em todas as combinações. Para a espécie *Cattleya aurantiaca*, a resposta foi semelhante apenas em algumas combinações e em *Laelia lobata*, outras combinações, aceleraram a porcentagem de mudas com folhas, porém, não a expansão delas.

Ao analisar as Figuras 2 e 4, pode-se notar a semelhança de comportamento nas doses 0,1 e 0,2g L⁻¹ do fungicida clorotalonil, em relação às respectivas variáveis, sendo assim, considerados os melhores tratamentos para a propagação *in vitro* de *Laelia lundii*. No entanto, ao calcularmos, através da regressão, a dosagem ideal de clorotalonil que nos fornece o máximo valor das variáveis estudadas, obtivemos: 0,28g L⁻¹; 0,20g L⁻¹; 0,16g L⁻¹ e 0,17g L⁻¹

para número de raízes/planta, comprimento da maior raiz/planta, altura da parte aérea/planta e peso fresco/planta, respectivamente. Em relação à resposta de crescimento para cada variável citada

anteriormente, os dados obtidos foram 5,35 raízes, 2,23cm, 2,37cm e 0,21g, respectivamente, para *Laelia lundii* (Figura 2).

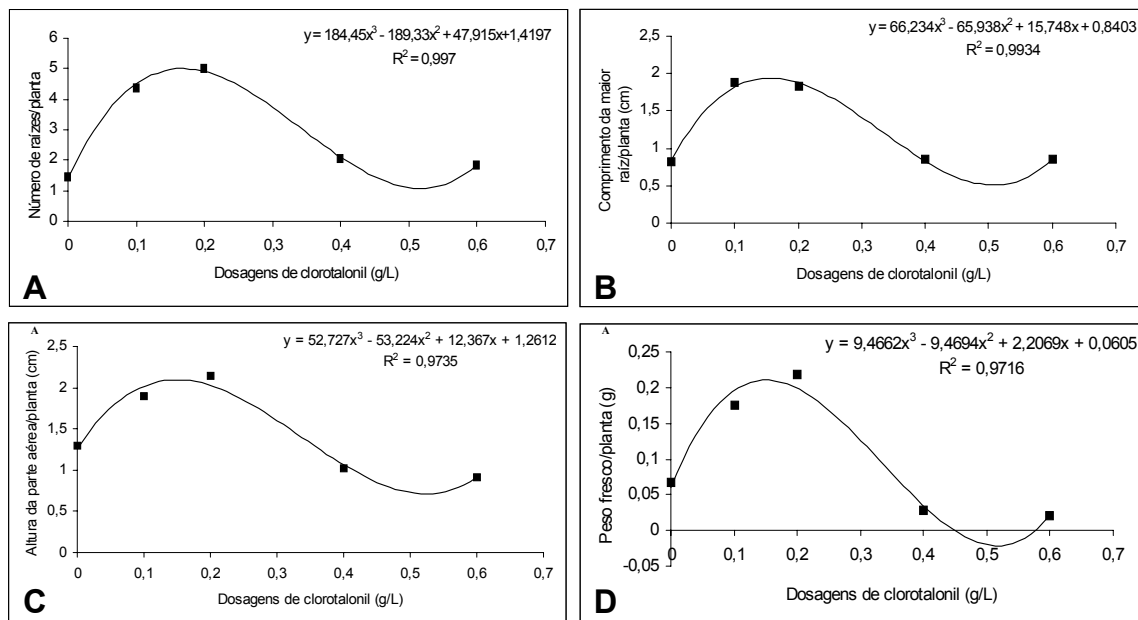


Figura 1. Influência das diferentes dosagens de clorotalonil na propagação *in vitro* de *C. loddigesii*, após 180 dias do início do experimento (A = número de raízes/planta; B = comprimento da maior raiz/planta; C = altura da parte aérea/planta; D = peso fresco/planta).

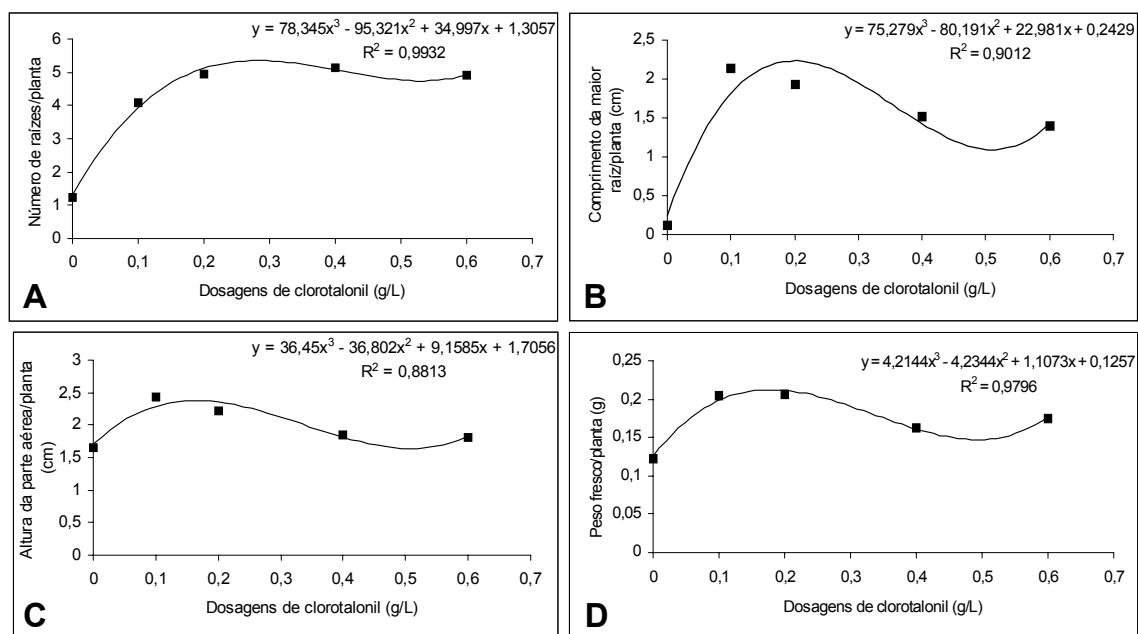


Figura 2. Influência das diferentes dosagens de clorotalonil na propagação *in vitro* de *L. lundii*, após 180 dias do início do experimento (A = número de raízes/planta; B = comprimento da maior raiz/planta; C = altura da parte aérea/planta; D = peso fresco/planta).

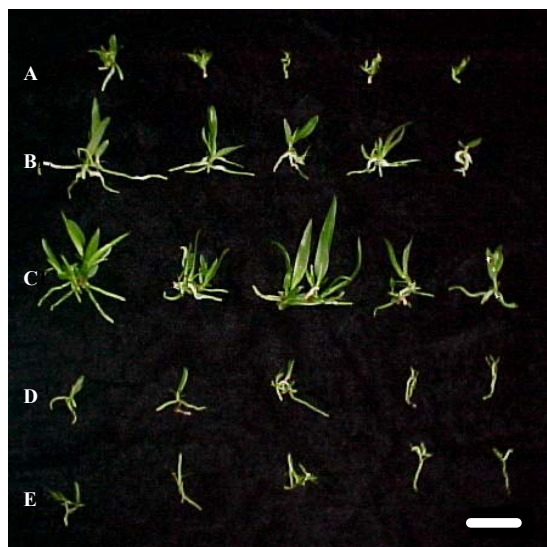


Figura 3. Plântulas de *C. loddigesii* propagadas *in vitro*, submetidas a diferentes dosagens do fungicida clorotalonil (A = 0,0g L⁻¹; B = 0,1g L⁻¹; C = 0,2g L⁻¹; D = 0,4g L⁻¹; E = 0,6g L⁻¹), após 180 de cultivo *in vitro* (barra = 1cm).

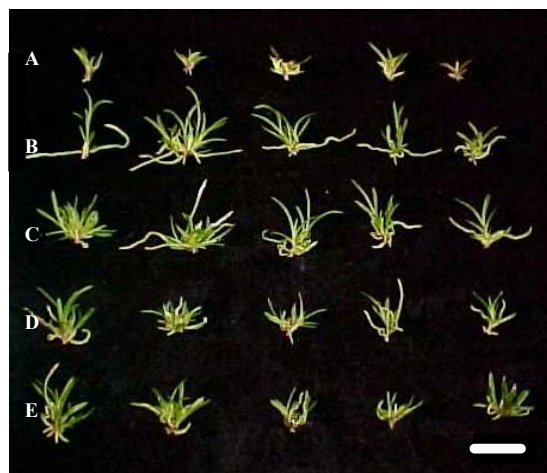


Figura 4. Plântulas de *L. lundii* propagadas *in vitro*, submetidas a diferentes dosagens do fungicida clorotalonil (A = 0,0g L⁻¹; B = 0,1g L⁻¹; C = 0,2g L⁻¹; D = 0,4g L⁻¹; E = 0,6g L⁻¹), após 180 de cultivo *in vitro* (barra = 1 cm).

Um outro fator importante abordado está representado na Tabela 2, onde pode ser observada a proporção de pegamento *ex vitro* das plântulas de *Cattleya loddigesii* e de *Laelia lundii*, respectivamente. Segundo Costa (1998), essa fase de aclimatização é muito delicada, porque além de representar um estresse para a plântula, existe o perigo de infecções por fungos e por bactérias. Um grande número de plantas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas das condições *in vitro* para o ambiente externo; porém, um fator importante para amenizar

esse problema é a obtenção de plântulas saudáveis, com sistema radicular e parte aérea proporcionais, a fim de atingir maior frequência de pegamento. Na tabela 2, para a espécie *C. loddigesii*, as doses 0,4 e 0,6g L⁻¹ do fungicida clorotalonil não foram consideradas, pois não foi realizado o transplante das plântulas, uma vez que elas não possuíam raízes suficientes (Figura 3). O mesmo ocorreu para a dose 0,0g L⁻¹, em ambas as espécies, em que foram transplantadas trinta e cinco plântulas. Foi observado, na dose 0,2g L⁻¹, para a espécie *Cattleya loddigesii*, e 0,1g L⁻¹, para a espécie *Laelia lundii*, que a proporção de pegamento, em porcentagem, foi de 98,00% e 86,00%, respectivamente. Sendo assim, nas referidas dosagens, o sistema radicular e a parte aérea foram proporcionais (Figuras 3 e 4), possibilitando uma maior frequência de sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Tabela 2. Proporção de pegamento de mudas de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*, 30 dias após o transplante para a casa de vegetação.

Orquídeas	Dose do clorotalonil (g.L ⁻¹)	Número de plantas transplantadas	Proporção de pegamento
<i>Cattleya loddigesii</i>	0	35	34,29 B ¹
	0,1	50	94,00 A
	0,2	50	98,00 A
	0,4	0	-
	0,6	0	-
<i>Laelia lundii</i>	0	35	0,00 B ¹
	0,1	50	86,00 A
	0,2	50	80,00 A
	0,4	50	74,00 A
	0,6	50	58,00 A

¹O teste utilizado foi o Qui-quadrado (χ^2) para várias proporções a 5% de significância.

Conclusão

As dosagens do fungicida clorotalonil que propiciaram um melhor desenvolvimento vegetativo, enraizamento e proporção de pegamento de mudas, durante a etapa de aclimatização, para as espécies *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii*, foram 0,1 e 0,2g L⁻¹.

Referências

- AYRES, M. *et al.* *BioEstat 2.0*: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Brasília: CNPq, 2000.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. *Experimentação agrícola*. 3. ed. Jaboticabal: Funep, 1995.
- BROWN, D. M. *et al.* Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v. 1, n.3, p. 165-179, 1982.
- COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto

- Agrônomo, 1998. p. 63-67.
- FARIA, R. T. et al. Substâncias fungicidas e germicidas na propagação *in vitro* de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 13., 2001, São Paulo. *Resumos...* São Paulo: SBFPO, 2001. p.149.
- GILADI, I. et al. A method for asseptid culture for bud explants from *Citrus* trees. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v.10, p.357-362, 1979.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas*. Brasília: ABCTP, 1990. p.99-169.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, v.1, n.1, p.30-33, mai/1997.
- LEIFERT, C. et al. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro*. *Crit. Rev. Plant Sci.*, Boca Raton, v.13, n.2, p.139-183, 1994.
- LONG, R. D. et al. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal culture. *Acta Hortic.*, The Hague, n. 225, p.83-92, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.15, p. 473-479, 1962.
- OLIVEIRA, de R. P. et al. Efeito da desinfestação e do uso de meios de indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. *Rev. Bras. Fruticult.*, Jaboticabal, v.22, n.1, p.57-61, 2000.
- RAMOS, J. D. et al. Efeito do triadimenol e da benzilaminopurina na multiplicação de brotos "*in vitro*" do porta-enxerto "Sunki". *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 43, n. 246, p.147-156, 1996.
- SILVA, W. *Cultivo de orquídeas no Brasil*. São Paulo: Nobel, 1976.
- STANCATO, G. C. et al. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.
- THOMAS, T. H. Growth regulatory effect of three benzimidazole fungicides on the germination of celery (*Apium graveoleus*) seeds. *Ann. Appl. Biol.*, Wellesbourne Warks, v.74, n.2, p. 233-238, 1973.
- WATT, M. P. et al. Effect of anti-fungal agents on *in vitro* cultures of *Eucalyptus grandis*. *South Africa Journal of Forestry*, Durban, n.175, p. 23-27, 1996.
- WRIGHT, N. et al. Micropropagation in horticulture: practice and commercial problems. *Institute of Horticulture*, London, p.200, 1986.
- YANG, H. T. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in cultura media. *HortScience*, Alexandria, v.11, n.5, p. 473-474, 1976.

Received on March 21, 2003.

Accepted on June 06, 2003.