

Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose

In vitro growth of *Oncidium baueri* (Orchidaceae) at different macronutrients and sucrose concentrations

Mauren Sorace¹; Ricardo Tadeu de Faria^{2*}; Clério Valentin Damasceno Júnior³;
Gisely Paula Gomes³; Cristiane Muniz Barbosa⁴;
Fabríola Giovanna Nesello Vieira⁵; Geraldo Lopes da Silva⁶;
Lúcia Sadayo Assari Takahashi⁷; Jenniffer Aparecida Schnitzer¹

Resumo

A propagação *in vitro* é uma importante técnica na reprodução de orquídeas, devido às sementes serem desprovidas de endosperma e apresentarem uma baixa taxa de germinação na natureza. A sacarose é um componente importante no meio de cultura servindo como fonte de carbono e energia para as plântulas e os macronutrientes são essenciais para a nutrição e crescimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. Os tratamentos consistiram em duas formulações dos macronutrientes do meio Murashige e Skoog (1962), sendo, MS completo e MS modificado com metade da concentração dos macronutrientes e de diferentes concentrações de sacarose (30 gL⁻¹, 40 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹), com pH 5,8. O delineamento experimental foi esquema fatorial 2 x 3 (meio x concentrações de sacarose) com oito repetições, contendo 20 plântulas por parcela. Os dados foram submetidos a análise de variância complementada pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os parâmetros avaliados após seis meses do início do experimento foram: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, número de brotos, massa fresca total e massa seca total. Constatou-se que no tratamento contendo 40 gL⁻¹ de sacarose e a metade da concentração dos macronutrientes do meio MS, foi o mais eficiente para o desenvolvimento vegetativo e no enraizamento da orquídea *Oncidium baueri*.

Palavras-chave: Carboidrato, orquídeas, cultura de tecido

Abstract

The propagation *in vitro* is an important method for orchids reproduction, because the seeds don't have endosperm and present low germination. The sugar is a important component in medium culture, serving as a source of carbon and energy. The objective of this study was to evaluate the growth *in vitro* of *Oncidium baueri* (Orchidaceae) in different macronutrients and sucrose concentrations. The treatments consisted: two formulations of the macronutrientes of the MS medium, in complete MS and

¹ Biólogas, Especialistas, Mestrandas da Universidade Estadual de Londrina. E-mail: mauren.uel@bol.com.br (bolsista CAPES).

² Eng^o Agr., Dr., Professor Adjunto do Departamento de Agronomia da UEL. Bolsa Produtividade CNPq. E-mail: faria@uel.br Londrina, PR.

³ Acadêmicos de Agronomia da UEL.

⁴ Acadêmica de Biologia da UEL.

⁵ Bióloga, UNIPAR.

⁶ Técnico do Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Agronomia da UEL.

⁷ Eng^a Agr^a, Doutoranda, Professora Adjunta do Departamento de Agronomia da UEL.

* Autor para correspondência

MS modified medium with half of the regular concentration of macronutrients, and different sucrose concentrations (30 gL⁻¹, 40 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹), at pH 5,8. A randomized design with eight replications was used as statistical model and a flask with twenty plants composed each plot. Data were submitted to analysis of variance, complemented by the Tukey test at 5% of significance. The following variables were assessed six months after the beginning of the experiment: plant height, root length; number of roots, number of buds, dry mass and total fresh mass. The treatment that showed the best results was 40 gL⁻¹ sucrose in a modified MS medium with half of regular concentration of macronutrients, for vegetative development and rooting of *Oncidium baueri* orchid.

Key words: Carbohydrate, orchids, tissue culture

Introdução

Oncidium baueri Lindl. é uma orquídea epífita nativa do Brasil, com crescimento simpodial e pseudobulbos estriados, verde-amarelados, achatados, com 11–13 cm de comprimento e 4–5 cm de largura (GARAY; STACY, 1974; PABST; DUNGS, 1977).

A propagação *in vitro* tem sido utilizada como um meio rápido de propagação vegetativa na indústria da horticultura ornamental e junto com outras técnicas biotecnologias, permite a obtenção de um grande número de plantas com autenticidade varietal e em qualquer época do ano. O sucesso desta técnica não só depende dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas também das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida, e do meio de cultura apropriado, que permite a indução, a multiplicação e o crescimento de brotações adventícias (NAGAO; PASQUAL; RAMOS, 1994).

A composição do meio de cultura é importante para a germinação da semente e o crescimento da planta, sendo geralmente constituído de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante. Os macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg e Fe) são essenciais para a nutrição e crescimento da plântula, suprindo todas as suas necessidades (MELO, 1999).

Reddy, Nanjan e Shanmugavelu (1992) avaliaram os meios de cultura: Murashige e Skoog, Knudson e Rosa, Laneri e Vacin e Went, para germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cymbidium aloifolius*, *Dendrobium crispdatum* e

Epidendrum radicans. Os meios nutritivos MS e Rosa e Laneri apresentaram os melhores resultados para desenvolvimento vegetativo das três espécies analisadas.

O meio nutritivo simplificado formulado com adubo comercial Peters® (3 gL⁻¹), sacarose (20 gL⁻¹), banana (60 gL⁻¹) e ágar (4 gL⁻¹) mostrou-se eficiente para o crescimento e enraizamento da orquídea *Dendrobium nobile* (SONG et al., 1999).

Segundo, Stancato e Faria (1996), em trabalho desenvolvido com diferentes composições de meio de cultura para a orquídea rupestre *Laelia cinnabarina*, obtiveram resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* em meio MS com metade da concentração dos macronutrientes.

De acordo com Bressan et al. (1999) observaram um melhor desenvolvimento de *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) *in vitro*, no meio de cultura com 1/3 da concentração de sais do MS e na presença de carvão ativado (2 gL⁻¹).

De acordo com Debergh (1991) e Kozai (1991), a sacarose é um componente importante no meio de cultura servindo como fonte de carbono e energia, sendo as plântulas cultivadas *in vitro* consideradas autotróficas.

Calvete et al. (2002), obtiveram os melhores resultados no desenvolvimento vegetativo na propagação *in vitro* do morango da cultivar Vila Nova com doses de 30 a 45 gL⁻¹ de sacarose.

De acordo com Riquelme, Guiñazu e Tizio (1991), que avaliaram o efeito de várias concentrações de sacarose na etapa de multiplicação *in vitro* de

plantas de morangueiro, batata, menta e videira, que concentrações de 30 à 45 gL⁻¹ foram as mais adequadas durante o pré-acondicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Segundo Aldrufeu (1987), a adição de 20 gL⁻¹ de sacarose no meio de cultura aumentou o número de plantas de *Geranium* enraizadas, bem como a quantidade de raízes por planta.

Experimentos com *Diuris longifolia* (Orchidaceae), mostraram que o enraizamento de mudas é promovido pelo aumento da concentração de sacarose de 20 à 40 gL⁻¹, pela adição de 0,05% de carvão ativado no meio de cultura (COLLINS; DIXON, 1992).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose no crescimento *in vitro* da orquídea *Oncidium baueri*.

Material e Métodos

As flores de *Oncidium baueri* foram polinizadas artificialmente e as cápsulas fechadas contendo as sementes foram coletadas após 6 meses na casa de vegetação. Posteriormente foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos e abertas no fluxo laminar. As sementes de *Oncidium baueri* foram germinadas em meio Murashige e Skoog (1962), e as plântulas ao atingirem 1 ± 0,5 cm de altura, foram subcultivadas em frascos contendo 250 mL de meio de cultura nos diferentes tratamentos.

Os tratamentos consistiram de dois tipos de formulações de macronutrientes no meio de cultura (MS completo e MS com metade dos macronutrientes) e diferentes concentrações de sacarose (30 gL⁻¹, 40 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹). Os meios de cultura foram acrescido 1 gL⁻¹ de carvão ativado, o pH ajustado para 6,0 e autoclavado a 120 °C à 1 atm, por 20 minutos. Posteriormente ao transplântio das mudas na câmara de fluxo laminar, os frascos foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 2 X 3 (meios x concentrações de sacarose) com oito repetições, contendo 20 plântulas por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5%. Para a análise estatística, os dados foram transformados em raiz quadrada para os variáveis número de brotos e número de raízes ($\sqrt{x + 0,5}$).

Os parâmetros avaliados após seis meses do início do experimento foram: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, número de brotos, massa fresca total e massa seca total.

Em seguida as mudas foram aclimatizadas em bandejas de isopor, utilizando o esfagno como substrato e colocadas na casa de vegetação, com 50% de luminosidade.

Resultado e Discussão

Os resultados de altura da parte aérea de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias referentes à altura da parte aérea de plântulas (cm) de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	3,09 aA	3,37 aB	2,94 aA
T2 – MS ½ Macronutrientes	3,04 bA	4,95 aA	3,37 bA

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Não houve diferença estatística no meio de cultura MS completo entre as diferentes concentrações de sacarose. No entanto, para o meio de cultura com metade dos macronutrientes a concentração de 40 gL⁻¹ de sacarose proporcionou maior desenvolvimento das mudas. E em relação aos meios de cultura o T2 foi superior ao T1.

Os dados relativos à altura parte aérea indicam que os melhores resultados ocorreram com a utilização do meio de cultura contendo MS ½ macro, com adição de 40 gL⁻¹ de sacarose (Tabela 1). No entanto, Fráguas et al. (2003), obtiveram crescimento

satisfatório de plântulas resultantes do cruzamento entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*, em meio de cultura MS contendo 20 gL⁻¹ de sacarose.

De acordo com Kosx (2007), trabalhando com diferentes meios de cultura e sacarose, os resultados satisfatórios com 20 e 40 gL⁻¹ de sacarose em meios de cultura MS e Knudson, proporcionando melhor sobrevivência e desenvolvimento das plântulas de *Dendrobium nobile*.

Os resultados do número de raízes de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias referentes ao número de raízes de plântulas de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	6,05 aA	7,30 aB	8,57 aA
T2 – MS ½ Macronutrientes	6,32 bA	10,37 aA	7,94 abA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* dados sujeitos a transformação $\sqrt{x+0,5}$

Para o número de raízes, não houve diferença estatística em relação as concentrações de sacarose no T1. Porém o tratamento 2, contendo MS ½ macro, com adição de 40 gL⁻¹ de sacarose apresentou maior número (10,37), diferindo estatisticamente da concentração de 30 gL⁻¹. Não houve diferença estatística nos tratamentos entre as concentrações de 30 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹, diferindo estatisticamente apenas da concentração de 40 gL⁻¹. De acordo com

George e Sherrington (1984) apud Oliveira (1994), concentrações elevadas de açúcar podem inibir a formação de raízes *in vitro*. Entretanto, efeitos satisfatórios ocorreram com Leite, Finardi e Fortes (2000) em experimento com porta-enxerto de pereira, quando utilizaram sacarose no meio.

Os resultados do comprimento da maior raiz de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias referentes ao comprimento da maior raiz (cm) de plântulas de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	0,94 aB	1,12 aB	1,05 aA
T2 – MS ½ Macronutrientes	1,92 bA	4,49 aA	1,57 bA

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O parâmetro comprimento da maior raiz, não houve diferença estatística entre as concentrações no tratamento 1. No entanto, no tratamento 2 a concentração de 40 gL⁻¹ foi a que obteve maior crescimento. Já em relação aos meios de cultura o tratamento 1, obteve os melhores resultados com a concentração 60 gL⁻¹, contudo o tratamento 2 não teve diferença estatística.

Del Rosário e De Guzman (1981) obtiveram um efeito positivo promovido pela alta concentração de açúcar no crescimento de raízes de embriões

de coqueiro “makapuno”, usando meio de cultura MS. De acordo com Guimarães, Pasqual e Miranda (1999), o maior número de raízes foi obtido com 7,5 gL⁻¹ de sacarose e o menor número em 60 gL⁻¹ de sacarose ambos na ausência de nitrogênio. Calvete et al. (2002), verificaram que plantas de morangueiro cultivar Campinas produzidas na concentração de 45 gL⁻¹ de sacarose, apresentaram enraizamento e na ausência não houve desenvolvimento de raízes.

Os resultados do número de brotos de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Médias referentes ao número de brotos de plântulas de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	2,40 aA	2,71 aA	2,55 aA
T2 – MS ½ Macronutrientes	2,42 aA	3,83 aA	2,87 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* dados sujeitos a transformação $\sqrt{x + 0,5}$

Para a variável número de brotos, as maiores médias foram alcançadas no tratamento contendo MS ½ macro, com adição de 40 gL⁻¹ de sacarose, no entanto, estatisticamente todos os tratamentos foram semelhantes. Guimarães, Pasqual e Miranda (1999), trabalhando com samambaia-espada e Loescher e

Albrecht (1979) apud Amaki e Higuchi (1992), com produção de brotos de pontas de estolhos da espécie *Nephrolepis exaltata* (L.) Schoot verificaram os melhores resultados com níveis mais diluídos do meio MS, em relação ao padrão.

Os resultados da massa fresca total de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Médias referentes a massa fresca total (mg) de plântulas de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	0,14 aA	0,16 aB	0,18 aA
T2 – MS ½ Macronutrientes	0,16 bA	0,33 aA	0,20 bA

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação a massa fresca total não houve diferença estatística entre as concentrações no tratamento 1, porém no tratamento 2 a concentração de 40 gL⁻¹ obteve os melhores resultados, diferindo estatisticamente das demais concentrações. No entanto, em relação ao meio de cultura no tratamento

1, não houve diferenças entre as concentrações 30 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹, diferindo estatisticamente da concentração de 40 gL⁻¹. No tratamento 2, não houve diferença estatística entre as concentrações.

Os resultados da massa seca total de *Oncidium baueri* são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Médias referentes a massa seca total (mg) de plântulas de *Oncidium baueri*, após seis meses do início do experimento.

Meio de Cultura	Concentrações de sacarose (gL ⁻¹)*		
	30	40	60
T1 – MS Completo	0,14 aA	0,01bA	0,04 bA
T2 – MS ½ Macronutrientes	0,08 aB	0,10 aA	0,07 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* dados sujeitos a transformação $\sqrt{x + 0,5}$

Os dados relativos à massa seca total indicam que no tratamento 1, houve diferença estatística entre as concentrações, sendo que a concentração de 30 gL⁻¹ obteve melhor resultado em relação as outras concentrações. Porém, no tratamento 2 não houve diferença estatísticas entre as concentrações no meio de cultura. O meio de cultura do tratamento 1, não houve diferença entre as concentrações. No tratamento 2, a melhor concentração foi a de 40 gL⁻¹ diferindo estatisticamente das outras concentrações.

Conclusão

O meio Murashige e Skoog (1962) com ½ macronutrientes e com adição de 40 gL⁻¹ de sacarose foi o mais eficiente no desenvolvimento vegetativo *in vitro* da orquídea *Oncidium baueri*.

Referências

- ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of pelargonium zonale plantlets. *Acta Horticulturae*, The Hague, n. 212, p. 361-366, 1987.
- AMAKI, W.; HIGUCHI, H. Micropropagation of Boston ferns. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Gainesville, v. 20, n. 104, p. 485-494, 1992.
- BRESSAN, E. A.; LEE, L. L.; SEVERO, V. S.; GERALD, L. T. S. Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro* – efeito do carvão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1999. p. 111.
- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- COLLINS, M. T.; DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R Br. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v. 32, n. 1, p. 131-135, 1992.

- DEBERGH, P. C. Control of *in vitro* plant propagation. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R. (Ed.). *Biotecnologia para produção vegetal*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 3-8.
- DEL ROZARIO, A. G.; DE GUZMAN, E. V. The growth of Makapuno coconut embryos in vitro as affected by mineral composition and sugar level of the medium during the liquid and solid culture. *Philippine Journal of Science*, Manila, v. 105, p. 215-222, 1981.
- FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Ceres*, Lavras, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.
- GARAY, L. A.; STACY, J. E. Synopsis of the genus *Oncidium*. *Bradea*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 40, p. 393-427, 1974.
- GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação “in vitro” de samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. *Ciência e Agrotécnica*, Lavras, v. 23, n. 2, p. 309-316, 1999.
- KOSX, D. A. Efeito de diferentes tipos de meio de cultura e concentrações de sacarose no desenvolvimento de um híbrido de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, New York, v. 27, n. 1, p. 47-51, 1991.
- LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “in vitro” do porta-enxerto de pereira OHXF97. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, 2000.
- MELO, A. V. *Micropropagação “in vitro” de Oncidium hians Lindl (Orchidaceae) em diferentes formulações de meio de cultura*. 1999. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “in vitro” de brotações de porta-enxerto de citros. *Bragantia*, Campinas, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.
- OLIVEIRA, P. D. *Propagação “in vitro” de crisântemo (Dendranthema grandiflora Tzlev.) cv. Orange Reagen*. Lavras: Esalq, 1994.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. *Orchidaceae Brasiliensis*. Hildeshim: Brucke – Verlag Kurt Schmiersow, 1977. v. 2.
- REDDY, P. V.; NANJAN, K.; SHANMUGAVELU, K. G. *In vitro* studies in tropical orchids: seed germination and seedling growth. *Coimbatore*, Índia, v. 6, n. 1-2, p. 75-78; 1992.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pré-acondicionamento y aclimatacion em condiciones de invernáculo de plântulas micropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, Buenos Aires, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- SONG, M. K. R.; SILVA, G. L.; FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1999. p. 110.
- STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae): effects of macro and microelements. *Lindleyana*, Palm Beach, v. 11, n. 1, p. 41-43, 1996.

