

Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar

Ricardo Tadeu de Faria*, Ronaldo José Durigan Dalio, Lilian Keiko Unemoto e Geraldo Lopes da Silva

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

RESUMO. O trabalho teve como objetivo a propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) sem uso de ágar como agente solidificante do meio de cultura. As sementes foram germinadas em meio Murashige e Skoog (MS, 1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes. As plântulas, ao atingirem em média 1 cm de altura, foram subcultivadas para frascos de plástico de 600 mL, contendo 200 mL do mesmo meio nutritivo utilizado para a germinação. Os tratamentos avaliados foram: 7 g de ágar por litro + meio 1/2 MS líquido; espuma de poliuretano picada + meio 1/2 MS líquido; esfagno + meio 1/2 MS líquido; areia grossa + meio 1/2 MS líquido. Oito meses após o início do experimento, as variáveis analisadas foram: altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de brotações, número de raízes e matéria fresca total. As análises estatísticas demonstram que os tratamentos contendo esfagno ou areia não são indicados para substituírem o ágar, porém o tratamento com espuma de poliuretano picada proporcionou um ótimo enraizamento e ótimo desenvolvimento vegetativo das plântulas, sendo, portanto, uma alternativa eficiente e de menor custo para a substituição do ágar na propagação *in vitro* de *Oncidium baueri*.

Palavras-chave: orquídeas, substratos, cultura de tecidos, biofábrica, redução de custos, *Oncidium*.

ABSTRACT. *In vitro* orchid propagation of *Oncidium baueri* (Orchidaceae) without the use of agar. This research aims at studying the *in vitro* propagation of *Oncidium baueri* (Orchidaceae) without the use of agar as a solidifying agent of culture medium. The seeds were germinated in Murashige and Skoog medium (MS, 1962) modified with half of the macronutrients concentrations. When the seedlings reach an average height of 1 cm, they were sub-cultivated in 600 mL plastic flasks containing 200 mL of the same nutritive medium used for germination. The evaluated treatments were: 7 g of agar per liter + 1/2 MS medium liquid; chopped (polyurethane) foam + 1/2 MS medium liquid; sphagnum + 1/2 MS medium liquid; thick sand + 1/2MS medium liquid. The evaluated variables after 8 months of study were: aerial part height, tallest root length, sprout number, root number and total fresh mass. The statistics analysis demonstrates that the sphagnum or thick sand treatments are not indicated to substitute the agar. However, the treatment with chopped polyurethane foam showed an optimum rooting and vegetative development of seedlings, being, therefore, an efficient and less costly alternative to replace the agar in the *in vitro* propagation of *Oncidium baueri*.

Key words: orchid, substrates, tissue culture, bio-factory, cost reduction, *Oncidium*.

Introdução

As orquídeas são plantas muito cobiçadas, devido à beleza de suas flores. Existem aproximadamente 35.000 espécies no planeta (Blossfeld, 1999), distribuídas em 6 tribos, 80 subtribos e cerca de 750 gêneros (Heywood, 1993). Algumas espécies de

orquídeas encontram-se, atualmente, ameaçadas de extinção, ou por práticas extrativistas, desempenhadas por colecionadores e comerciantes, ou pela devastação das matas, seu ambiente natural (Colombo *et al.*, 2004).

O gênero *Oncidium* é formado por 315 espécies, distribuídas em 19 seções; o Brasil abriga 94 espécies

nativas, em 15 diferentes seções, isto é, aproximadamente 30% do número total de espécies (Ferrarezi, 2002). A espécie brasileira *Oncidium baueri* possui um alto potencial ornamental em projetos paisagísticos e também como flor de corte. Sua inflorescência apresenta flores amarelas com hastes que chegam a quatro metros de comprimento.

As orquídeas apresentam desenvolvimento vegetativo lento, visto que a propagação por divisão de touceira leva, no mínimo, dois anos, o que torna lenta e onerosa a multiplicação em grandes quantidades para a comercialização de mudas. A propagação de orquídeas por sementes também é demorada e, das milhões de sementes produzidas em uma cápsula, somente 5% germinam. O cultivo em meio nutritivo, utilizando a técnica de cultura de tecidos, permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando o processo de multiplicação de orquídeas viável (Stancato e Faria, 1996).

O método mais utilizado para a produção de orquídeas em larga escala pelos produtores é a propagação *in vitro*, que 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 seu custo. Além disso, a propagação *in vitro* tem contribuído para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (Stancato *et al.*, 2001).

O ágar tem sido muito utilizado na propagação *in vitro*, pela sua grande eficiência como agente gelificante, promovendo condições ideais de suporte para as plântulas (Waes, 1987; Stancato e Faria, 1996; Faria *et al.*, 2002). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), há uma tendência mundial para se buscarem sistemas utilizando meio líquido, em virtude da redução do custo pela eliminação do ágar e da maior agilidade na preparação do meio de cultura.

De acordo com Adelberg *et al.* (1997), o ágar é rotineiramente utilizado como agente solidificante em meios nutritivos, embora meios líquidos tenham apresentado vantagens, como crescimento mais vigoroso, quando usados com aeração ou técnicas de suporte na propagação *in vitro* de híbridos de *Cattleya*. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), substratos inertes, como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano, embebidas em meio líquido, podem ser alternativas de menor custo que o ágar.

Afreen-Zobayede *et al.* (2000) desenvolveram trabalho com vermiculita e polpa de papel como materiais de suporte para propagação *in vitro* de batata doce, com o intuito de redução do custo, e

obtiveram resultados de matéria fresca total de raízes e parte aérea 2,7 vezes maior do que no tratamento com ágar. Mohan *et al.* (2004) utilizaram bagaço de cana como suporte alternativo de baixo custo ao ágar para a propagação *in vitro* de maçã, obtendo ótimos resultados. Esses autores concluíram que é possível substituir agentes gelificantes por suportes alternativos.

O esfagno é muito usado na fase de aclimatização das orquídeas (Chen e Chang, 2000 e 2004). Kren *et al.* (2002) obtiveram bons resultados com a areia como substrato quando desenvolveram trabalho de enraizamento de variedades de *Clematis* testando diferentes substratos. Zimmerman e Broome (1979) utilizaram a mistura vermiculita, perlita e areia para o enraizamento de diversas variedades de macieira, com resultados superiores ao meio de cultura contendo ágar.

O objetivo deste trabalho foi a propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) utilizando-se substratos alternativos ao meio de cultura solidificado com ágar.

Material e métodos

As plântulas de *Oncidium baueri* Lindl. foram obtidas por semeadura *in vitro*, a partir de cápsulas fechadas obtidas por polinização artificial, seguindo-se o método descrito por Faria (1998).

As mudas, seis meses após a semeadura no meio MS (Murashige e Skoog, 1962), modificado com a metade da concentração dos macronutrientes (1/2 MS), apresentaram a altura média da parte aérea de $1,0 \pm 0,3$ cm. Estas plântulas foram subcultivadas no meio 1/2 MS líquido e com diferentes substratos: 7 g de ágar por litro + meio 1/2 MS líquido; espuma de poliuretano picada (flocos de 1 cm^3 de volume em média) + meio 1/2 MS líquido; esfagno (fibroso) + meio 1/2 MS líquido; areia grossa (granulometria alta) + meio 1/2 MS líquido.

Utilizaram-se frascos de plástico de 600 mL de volume, com 8 cm de altura, contendo 200 mL do meio 1/2 MS líquido. Os diferentes substratos foram, então, inseridos até que se atingisse 1/3 da altura desses frascos, que, posteriormente, foram autoclavados a 120°C, a 1 atm, por 20min. O pH dos meios nutritivos foi ajustado para 6, utilizando hidróxido de potássio, antes da autoclavagem. As plântulas foram subcultivadas no interior da câmara de fluxo laminar, os frascos foram vedados com filme PVC e mantidos na sala de crescimento à temperatura de 26°C e 16h de fotoperíodo.

As avaliações da altura da parte aérea, matéria fresca total, número de raízes, número de brotações e comprimento da maior raiz foram feitas oito meses após o início do experimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por cinco repetições e 20 plântulas por frasco. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias com teste estatístico de Tukey, com intervalo de confiança de 5%.

Resultados e discussão

A Tabela 1 mostra dados de desenvolvimento das plântulas de *Oncidium baueri* nos diferentes substratos.

Tabela 1. Médias referentes à altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de brotações, número de raízes e matéria fresca total, de plântulas de *Oncidium baueri*, oito meses após início do experimento.

Tratamentos	Altura da parte aérea (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Número de brotações	Número de raízes	Matéria fresca total (g)
água	3,24 b ¹	1,47 b	1,06 a	4,90 a	0,16 b
espuma picada	4,51 a	2,13 a	0,98 a	5,35 a	0,35 a
esfagno	1,57 c	0,79 d	0,53 b	2,53 b	0,03 c
areia grossa	1,33 c	1,19 c	0,38 b	2,53 b	0,04 c
(CV%)	16,21	16,32	28,62	20,18	29,25

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

A análise de dados relativa à altura da parte aérea expressou diferença significativa por ação dos substratos, destacando-se o tratamento contendo espuma de poliuretano picada, que atingiu a maior média, 4,51 cm, seguido pelo tratamento com água, que apresentou média de 3,24 cm. As mudas mantidas no meio de cultura com esfagno, e com areia grossa, apresentaram crescimento da parte aérea inferior ao apresentado pelas mudas mantidas com água ou espuma de poliuretano picada (Tabela 1).

As plântulas no meio com espuma de poliuretano picada também apresentaram as raízes maiores (Tabela 1), seguidas pelos tratamentos com água, areia grossa e esfagno. O número de brotações e o número de raízes das plântulas mantidas no meio contendo água e espuma picada não apresentaram diferenças significativas, obtendo valores mais altos do que esfagno e areia grossa. Para a variável matéria fresca total, as plântulas que cresceram no meio com espuma picada obtiveram maiores resultados (Tabela 1), possivelmente devido ao maior desenvolvimento da parte aérea e das raízes.

As plântulas que cresceram nos meios contendo esfagno e areia grossa apresentaram valores de médias inferiores às plântulas que cresceram no meio

com água, mostrando-se menos propícios para a sua substituição na propagação *in vitro* de *O. baueri* (Tabela 1).

Provavelmente, o substrato espuma de poliuretano picada apresenta menor resistência ao desenvolvimento radicular, quando comparado aos substratos esfagno e areia grossa, propiciando, portanto, um maior crescimento de raízes e conseqüentemente um maior desenvolvimento da parte aérea.

Comparando-se os meios de cultura solidificados com água e o contendo espuma picada + meio líquido, pode-se dizer que este último apresentou maior crescimento das plântulas, provavelmente, porque, de acordo com Caldas *et al.* (1998), meios sólidos apresentam estabelecimento de gradientes de nutrientes, o que não ocorre em meios líquidos, que são homogêneos, propiciando maior desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea.

Gerbhardt (1985) e Joyce e Cassels (2002) utilizaram espuma de poliuretano como suporte alternativo ao água na propagação *in vitro* de amora e de batata, respectivamente, obtendo ótimos resultados.

A espuma de poliuretano picada também oferece vantagem em relação ao uso do água do ponto de vista econômico, já que apresenta menor custo e conseqüentemente diminui o custo da produção de mudas *in vitro*.

Conclusão

O substrato espuma de poliuretano picada pode ser usado como alternativo ao água na propagação *in vitro* de *Oncidium baueri*.

Referências

- ADELBERG, J.W. *et al.* Long term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid membrane sistem. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v. 48, p. 1-7, 1997.
- AFREEN-ZOBAYEDE, F. *et al.* A combination of vermiculite and paper pulp suporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Sci.*, Limerick, v. 157, p. 225-231, 2000.
- BLOSSFELD, A. *Orquidologia, Orquidofilia e Orquicultura*. Jaboticabal; Funesp, 1999.
- CALDAS, L.S. *et al.* In: TORRES, A.C. *et al.* (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, p. 87-132.
- CHEN, J.; CHANG, W.; Plant regeneration via embryo and shoot bud flower-stalk explants of *Oncidium Sweet Sugar*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v. 62, p. 95-100, 2000.

- CHEN, J.; CHANG, W.; Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *Formosa* Shimadzu. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, Largo, v. 40, p. 290-293, 2004.
- COLOMBO, L.A. et al. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Sci.*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.
- FARIA, R.T.; Micropropagação de *Dendrobium nobile* *in vitro*. In: TOMBOLATO, A.F.C; COSTA, A.M.M. (Ed.). *Micropropagação de plantas ornamentais*. Boletim técnico n. 174. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 63-67.
- FARIA, R.T. et al. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breed. Biotechnol.*, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.
- FERRAREZI, E. *As espécies do gênero Oncidium Sw. Sensu lato (Orchidaceae) do Estado do Paraná*. 2002. Monografia-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.
- GEBHARDT, K. Development of a sterile cultivation sistem for rooting of shoot tip cultures (red raspberries) in duroplast foam. *Plant Sci.*, Limerick, v. 39, n. 2, p. 141-148, 1985.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES et al. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, p. 183-260.
- HEYWOOD, V.H. *Flowering plants of the world*. London: B.T. Batsford, 1993.
- JOYCE, M.S.; CASSELS, A.C. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v. 70, p. 125-137, 2002.
- KREN, S. et al. Rooting of clematis microshoots and stem cuttings in diferent substrates. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 96, p. 351-357, 2002.
- MOHAN, R. et al. Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, Largo, v. 40, p. 408-411, 2004.
- 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.
- STANCATO, G.C.; FARIA, R.T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (ORCHIDACEAE) I: effects of macro and microelements. *Lindleyana*, West Palm Beach, v. 11, n. 1, p. 41-43, 1996.
- STANCATO, G.C. et al. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, Campinas, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.
- WAES, J. Effects of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. *Acta Hortic.*, The Hague, v. 212, p. 131-138, 1987.
- ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O.C. *In vitro* propagation of apple cultivars. *Hortscience*, Alexandria, v. 14, p. 478, 1979.

Received on April 26, 2005.

Accepted on November 26, 2005.