

Substratos alternativos ao ágar para o cultivo *in vitro* de *Bifrenaria tyrianthina* (Loudon) Rchb. f. (Orchidaceae)

Gonçalves, Letícia de Menezes¹; Pujals, Alexandrina²; Santana, Tamara Francislaine³; Milaneze-Gutierrez³, Maria Auxiliadora.

¹Doutoranda do programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), let_over@hotmail.com. ²Pós-graduação em Planejamento Ambiental (CESUMAR), Campus Sede, Av. Guedner, 1610, Maringá, Paraná, CEP 87050-390, fone: (44) 3027-6360, e-mail: ale_pujals@hotmail.com; ³Departamento de Biologia, Laboratório de Cultivo de Orquídeas do MUDI, UEM, Av. Colombo, n. 5790, 87020-900, fone: (44) 3261-4961, tfbio2004@hotmail.com e milaneze@uem.br.

INTRODUÇÃO

No Brasil a flora de orquídeas é ampla e com muitas espécies endêmicas com valor ornamental. Dentre estas destaca-se *Bifrenaria tyrianthina*, de hábito rupícola, grande porte, com flores atrativas de coloração rósea, o que também a torna alvo do extrativismo por parte de colecionadores e comerciantes. Este gênero possui cerca de 35 espécies, com 25 delas ocorrendo no Brasil, principalmente na região sudeste.

Na família Orchidaceae, o estágio compreendido entre a germinação e o florescimento é considerado lento (Stoutamire, 1964), podendo alcançar vários anos. Também é baixa a taxa de multiplicação por meio dos métodos convencionais, como divisão de rizomas e brotações (a partir de gemas laterais dormentes) ou 'keikis', o que não atende à demanda comercial (Araújo, 2004), e favorece o extrativismo.

Com a técnica do cultivo *in vitro* é possível obter grande quantidade de plântulas em um curto espaço de tempo, independente da sazonalidade, com alta qualidade genética e fitossanitária, mesmo com espaço físico reduzido, possibilitando a redução de custos, e ainda é relevante do ponto de vista comercial (Araújo, 2004).

O substrato mais utilizado no cultivo *in vitro* é o ágar 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; Faria *et al.*, 2006). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) há uma tendência mundial para a adequação das metodologias *in vitro* utilizando-se meio líquido, em virtude da redução do custo pela eliminação do ágar e da maior agilidade na preparação do meio de cultura. Os autores acima afirmam que substratos inertes, como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano, embebidas em meio nutritivo líquido, podem ser alternativas de menor custo que o ágar; enquanto que Mohan *et al.* (2004) utilizaram bagaço de cana como suporte alternativo, de baixo custo, para a propagação *in vitro* de maçã, obtendo ótimos resultados.

Com a importância do cultivo *in vitro* como ferramenta para o combate à biopirataria e o possível barateamento de custo da produção de orquídeas, o presente trabalho teve por objetivo encontrar substratos alternativos ao ágar para o cultivo *in vitro* de *B. tyrianthina*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a elaboração dos experimentos foram utilizadas plântulas de *B. tyrianthina* com 1 ou 2 folhas, obtidas de sementes advindas do município de Umuarama (PR) e mantidas assimbioticamente em meio de cultura "C" de Knudson (meio básico) (Knudson, 1946). Após 6 meses de cultivo, aproximadamente 50 destas plântulas (fase de 1 ou 2 folhas) foram transferidas para novas réplicas contendo 100 mL do meio básico + 6g/L de ágar (controle); 100 mL do meio básico + 6g de bagaço de cana-de-açúcar ou 100 ml do meio básico + 8g de palha de arroz seca (ambos previamente autoclavados por uma hora a 1 atm). O pH do meio nutritivo foi ajustado para 5,3 antes da autoclavagem por 20 minutos a 1 atm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por três tratamentos (substratos), com 5 repetições cada, as quais permaneceram por 12 meses sob iluminação fluorescente contínua e 25±3°C, no Laboratório de Cultivo de Orquídeas do Museu Dinâmico Interdisciplinar da Universidade Estadual de Maringá.

A análise das culturas incluiu: número de raízes, folhas, pseudobulbos e brotações laterais por plântula. Quanto ao comprimento das raízes foram estabelecidas classes com intervalos de 2 cm, e para a parte aérea, de 3cm.

Para a comparação dos dados obtidos foi utilizada a análise de variância juntamente com comparações das médias através do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa de computador Assistat versão 7.4 beta (Silva e Azevedo, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das culturas de *B. tyrianthina* demonstrou que o número de raízes nas plântulas mantidas na presença do ágar foi superior ao observado nos substratos alternativos (Tabela 1), permanecendo as culturas com bagaço de cana e a palha de arroz sem diferença significativa entre si, com aproximadamente a metade do valor (3,55 e 3,08, respectivamente) das culturas controle.

Tabela 1. Números médios de raízes, folhas, brotos e pseudobulbos por plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*.

Tratamentos	Nº de raízes	Nº de folhas	Nº de brotos	Nº de pseudo-bulbos
Ágar	6,35 a ¹	11,09 a	1,62 a	1,13 a
Bagaço de cana	3,55 b	9,02 ab	2,32 a	1,22 a
Palha de arroz	3,08 b	7,36 b	0,65 b	1,05 a

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

Em relação ao comprimento das raízes (Tabela 2) a classe 2 (entre 0,1 e 2,0 cm) apresentou resultados distintos entre os substratos, com destaque para as culturas controle (média de 5,87 destas raízes por plântula), o que difere dos resultados de Mohan (2005) ao observarem que o bagaço de cana foi o melhor substrato para o cultivo de plântulas de maçã *in vitro*, visto que tal substrato propicia uma melhor oxigenação das raízes, devido a sua estrutura porosa, o que induz um aumento no número de raízes. Em adição, Leite (1995) faz refere-se às raízes de pêra crescidas em ágar como pouco eficientes na absorção de água e nutrientes por serem pouco ramificadas, quebradiças e isentas de pêlos de absorção. Quanto às orquídeas, Faria *et al.* (2006) obtiveram maiores médias de raízes nas plântulas de *Oncidium baueri* cultivadas em espuma de poliuretano picada, embora estatisticamente semelhante às culturas com ágar.

Quanto ao número de folhas por plântula (Tabela 1), novamente aquelas mantidas em ágar apresentaram mais folhas, diferenciando-se estatisticamente daquelas cultivadas em palha de arroz, que proporcionou o menor valor médio (7,36). Quanto ao comprimento da parte aérea (Tabela 3), a classe 2 (3,1-6,0 cm) foi a única que apresentou diferença estatística entre o tratamento bagaço de cana (0,38 cm) e o palha de arroz.

O tratamento bagaço de cana e ágar apresentaram os maiores valores médios de brotos laterais por plântula (Tabela 1), diferenciando-se do tratamento palha de arroz. Quanto à presença destes brotos cerca de 70% das plântulas mantidas em ágar os apresentaram, diferindo estatisticamente apenas do tratamento palha de arroz (37,67%) (Tabela 4). Entre os substratos analisados não foram observadas diferenças estatísticas quanto ao número de pseudobulbos por plântula (Tabela 1), sendo a média geral igual a 1,13. Entretanto, quando calculada a porcentagem de pseudobulbos presentes nas plântulas de cada cultura, obteve-se diferença significativa a favor do tratamento ágar, em que 70,7% das plântulas os apresentaram, em detrimento aos outros substratos, com valores em torno de 25%, e não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 4).

Tabela 2. Comprimento das raízes das plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*, números médios por plântula.

Tratamentos	Médias do comprimento de raiz (cm)				
	Classes				
	Classe 1 0,1- 2,0	Classe 2 2,1- 4,0	Classe 3 4,1- 6,0	Classe 4 6,1- 8,0	Classe 5 > 8,1
água	5,87 a ¹	1,10 a	0,27 a	0,04 a	0,00 a
Bagaço de cana	2,18 b	0,76 a	0,43 a	0,16 a	0,08 a
Palha de arroz	1,21 c	0,86 a	0,35 a	0,16 a	0,24 a

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

Tabela 3. Comprimento da parte aérea das plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*, números médios por plântula.

Tratamentos	Médias do comprimento de parte aérea (cm)			
	Classes			
	Classe 1 0,1- 3,0	Classe 2 3,1- 6,0	Classe 3 6,1- 9,0	Classe 4 > 9,1
água	0,18 a ¹	0,51 ab	0,31 a	0,00 a
Bagaço de cana	0,26 a	0,38 b	0,29 a	0,01 a
Palha de arroz	0,20 a	0,55 a	0,19 a	0,02 a

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

Tabela 4. Porcentagens de brotos e pseudobulbos, por plântulas de *Bifrenaria tyrianthina*, dados médios.

Tratamentos	Porcentagem de brotos	Porcentagem de pseudobulbos
Água	71,98 a ¹	70,73 a
Bagaço de cana	65,66 ab	27,99 b
Palha de arroz	37,67 b	25,21 b

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

A análise do pH alcançado pelo meio de cultura na presença dos três substratos, após 12 meses de cultivo, revelou que as culturas com água ou bagaço de cana não apresentaram diferença estatística entre si, com médias de 3,07 e 3,84 respectivamente; enquanto que nas réplicas com palha de arroz este valor foi significativamente mais elevado, 5,32, e incomum para culturas *in vitro* com plântulas em estágio avançado de desenvolvimento.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados acima, o água mostra-se como o substrato mais indicado para o cultivo assimbiótico de *B. tyrianthina*, quando comparado ao bagaço de cana e palha de arroz. Este último foi considerado a alternativa menos indicada para o cultivo *in vitro* desta espécie, possivelmente devido a propriedade de manter o pH da solução nutritiva relativamente elevado, para esta fase de desenvolvimento das plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas**. Dissertação (mestrado) Lavras Universidade Federal de Lavras, 73 p., 2004.
- 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.
- FARIA, R.F.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO L.K.; SILVA G.L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 7174, 2006.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p.183–260, 1998.
- LEITE, G. B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. **Dissertação de Mestrado**, Pelotas: UFPel, 1995.
- KNUDSON, L. **A new nutrient solution for germination of orchid seeds**. Amer. Orchid. Soc. Bull. V. 15, p. 214-7, 1946.
- 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.
- MOHAN, R. (2005), **Desenvolvimento de bioprocessos: bagaço de cana-de-açúcar como suporte alternativo na fase de enraizamento e aclimação de plântulas de macieira, morangueiro e cafeeiro**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- SILVA, F. de A. & AZEVEDO, C.A.V. de A. A new version of The Assisat- Statistical Assistance Software. In: **World Congress on computers in agriculture**, 4, Orlando-FL-USA: Anais...Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p. 393-396, 2006.
- 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. 4143, 1996.
- STOUTAMIRE, W.P. Seeds and seedling of native orchids. **Mich. Bot.**, v.3, n.4, p. 104-119, 1964
- WAES, J. Effects of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. **Acta Hort.**, The Hague, v. 212, p. 131-138, 1987.
- PALAVRAS-CHAVE: bagaço de cana, cultivo assimbiótico, substratos alternativos, orquídeas.