

Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo

Gessiel Newton Scheidt¹
 André Luís Lopes da Silva²
 Alessandro Garret Dronk²
 Luiz Antonio Biasi³
 Andréa Haruko Arakaki²
 Carlos Ricardo Soccol²
soccol@ufpr.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes sistemas na multiplicação in vitro de Oncidium leucochilum. Os tratamentos utilizados foram dois tipos de biorreatores (RITA® e BIB®), ambos os sistemas com imersão temporária (30 minutos a cada 2 horas) e o cultivo convencional em meio líquido. O meio de cultura foi o MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP, 0,25 mg.L⁻¹ de ANA e 5 µL.L⁻¹ de Tween® 20, o pH foi ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±2°C, sob luz branca fria (35 µM.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições de vinte explantes. Aos 45 dias de cultivo in vitro foi observado que os explantes cultivados no biorreator BIB® apresentaram maior número de brotações por explante (6,56), maior incremento de massa fresca (5,7g), maior massa seca total (0,59 g) e altura da parte aérea (1,87 cm), comparado aos explantes cultivados no biorreator RITA® e no sistema convencional. O biorreator BIB® apresenta-se como uma alternativa viável, eficiente e com menor custo para a multiplicação in vitro de O. leucochilum.

Palavras-Chave: Biorreatores; orquídeas; plantas ornamentais; BIB; micropropagação.

In vitro multiplication of *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) in different culture system

ABSTRACT

The objective of this work was to compare different systems on in vitro multiplication of Oncidium leucochilum. The treatments were two types of bioreactors: RITA® and BIB®, both with temporary immersion (30 min each 2 h) and the conventional culture in liquid medium. Culture medium was MS supplemented with 1 mg.L⁻¹ BAP, 0.25 mg.L⁻¹ NAA and 5 µL.L⁻¹ Tween® 20, the pH was adjusted to 5.8. Cultures were kept in a growth room with 25±2°C, under cool white light (35 µM.m⁻².s⁻¹), with 16 hours of photoperiod. The experimental design was complete randomized with 3 replicates of 20 explants. After 45 days of in vitro culture was observed that explants cultivated in bioreactor BIB® showed higher shoot number per explant (6.56), higher fresh mass increment (5.7g), larger dry mass (0.59g) and aerial part height (1.87cm) compared to explants cultured at bioreactor

¹ Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gorupi.

² Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia.

³ Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Micropropagação. soccol@ufpr.br

RITA[®] and conventional culture. The bioreactor BIB[®] is a viable alternative, efficient and had lowest cost for *in vitro* multiplication of *O. leucochilum*.

Keywords: Bioreactors; orchids; ornamental plants; BIB; micropropagation.

INTRODUÇÃO

Oncidium leucochilum ocorre no México, Guatemala e Honduras. Esta espécie apresenta características ornamentais muito desejadas para a obtenção de híbridos com interesse comercial (HÁGSATER, et al. 2005). A propagação *in vitro* é a única ferramenta atualmente disponível para a produção massal de híbridos de orquídeas, entretanto meios de cultivo semi-sólidos apresentam custo elevado pelo uso de agentes solidificantes. O emprego de meios de cultivo líquidos confere uma redução nos custos de produção. Além disso, biorreatores com meios de cultivo líquido permitem a multiplicação de propágulos em larga escala automatizando o processo e, reduzem a mão de obra, consequentemente diminuindo o custo por muda produzida (ROELS, et al., 2006). O objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de usar o biorreator por imersão de bolhas (BIB[®]) como alternativa para a multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum*.

MATERIAL E MÉTODOS

As cápsulas fechadas de *Oncidium leucochilum* Batem. Ex Lindl. foram desinfestadas com imersão em álcool 70% por 1 min, seguida da imersão em NaOCl (2,5%) por 20 min, e após foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, as cápsulas foram abertas e as sementes inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a metade da concentração dos sais, vitaminas completas, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g.L⁻¹ de agar (pH ajustado para 5,8). Aos 30 dias da inoculação das sementes, as plântulas originadas da germinação *in vitro* foram subcultivadas para o mesmo meio. Plântulas enraizadas (ca. 0,5 cm de altura) foram transferidas para os tratamentos: (1) Cultivo convencional (controle) em frascos de vidro de 200 mL (meio líquido); (2) biorreator RITA[®] (Recipiente de Imersão Temporária Automatizada) e (3) biorreator BIB[®] (Biorreator de Imersão por Bolhas), ambos os sistemas com ciclos de aeração a cada 2 horas por 30 minutos (Gráfico 1). No experimento foi utilizado o meio MS líquido suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,25 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1 mg.L⁻¹ de tiamina e 5 µL.L⁻¹ de Tween[®] 20, o pH foi ajustado para 5,8. Foram utilizados 200 mL de meio nos biorreatores e 20 mL nos frascos de cultivo convencional (controle).

Foram avaliados o número total de brotações, massa fresca total (g), massa seca total (g), incremento da massa

fresca (quociente entre a massa fresca final e a massa fresca inicial), altura da parte aérea (cm), número de raízes, comprimento das raízes e o comprimento da maior raiz (cm) aos 45 dias de cultivo *in vitro*. O comprimento das raízes foi realizado com auxílio do equipamento WINRHYZO[®]. No biorreator BIB[®] dois estágios foram usados (Gráfico 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições de 20 plântulas por unidade experimental. Os dados oriundos de contagens foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001). Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e intensidade luminosa de 35 µM.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-fria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa fresca total, o número de raízes e o comprimento da maior raiz não apresentaram significância estatística em nenhum dos tratamentos (Tabela 1). O comprimento das raízes das plântulas foi favorecido nos biorreatores, não apresentando diferenças estatísticas entre o biorreator BIB[®] e RITA[®], entretanto foi significativamente inferior nas plântulas cultivadas nos frascos do sistema convencional (Tabela 1). Na propagação *in vitro* de bromélias foi observado que biorreatores apresentaram resultados superiores aos obtidos com cultivo em sistema convencional (RECH FILHO, 2004).

O número total de brotações, massa seca total, incremento de massa fresca e a altura da parte aérea foram significativamente superiores nas plântulas cultivadas no biorreator BIB[®], e não foram significativas nas plântulas cultivadas no biorreator RITA[®] e nos frascos de cultivo convencional (Tabela 1). O BIB[®] promoveu um número total de brotações de 6,5 por explante comparado a 5,1 e 5,4 obtidas pelo biorreator RITA[®] e cultivo convencional, respectivamente (Tabela 1). A altura da parte aérea também é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações (MOREIRA, et al., 2003), consequentemente permitindo maior multiplicação.

Em helicônias cultivadas em biorreatores de imersão temporária, foi observado que uma maior área de contato dos explantes com o meio de cultivo líquido proporciona maior absorção dos nutrientes e consequentemente

umenta a produção (RODRIGUES, et al., 2006). Além disso, o volume dos frascos também interfere no desenvolvimento dos explantes geralmente, quanto maior o volume dos recipientes, maior é o crescimento e a multiplicação dos explantes (ETIENNE & BERTHOULY, 2002). O maior volume do recipiente do BIB[®] pode ser uma das razões para a obtenção dos melhores resultados para as variáveis, número de brotos, massa seca total, incremento da massa fresca e a altura da parte aérea em relação ao RITA[®] e ao cultivo convencional (Tabela 1).

Outro fator que parece ter favorecido o crescimento dos explantes no BIB[®] é o maior volume e transparência do seu recipiente, o que pode ter permitido maior disponibilidade de CO₂ e de luz resultando num aumento da taxa fotossintética dos explantes. O RITA[®] apresenta um recipiente menor do que o do BIB[®], além do recipiente ser translúcido, o que pode resultar em menor disponibilidade de luz e CO₂. Em *Cymbidium* cultivado *in vitro*, foi constatado maior taxa fotossintética em ambiente enriquecido com CO₂ (2.000 ppm) e 200 μM.m⁻².s⁻¹ do que em 35 μmol.m⁻².s⁻¹ na mesma concentração de CO₂ (KOZAI, et al., 1987).

Comparando estes três sistemas de cultivo na multiplicação *in vitro* de *O. leucochilum*, constatamos que o biorreator BIB[®] apresenta menor custo com relação ao cultivo comercial pela automatização no processo, o que dispensa mão de obra e também apresenta-se mais barato que o uso do biorreator RITA[®] pelo simples fato de que o recipiente desse biorreator apresenta uma curta vida útil, suportando poucas autoclavagens. Já o recipiente do BIB[®] como é construído de vidro ao invés de plástico pode ser autoclavado sem que haja diminuição da sua vida útil, podendo ser autoclavado inúmeras vezes.

Em conclusão, o uso do biorreator de imersão por bolhas (BIB[®]) apresenta-se como uma alternativa viável, eficiente e com menor custo para a multiplicação *in vitro* de *O. leucochilum*.

REFERÊNCIAS

- [1] CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2001, 648p.
- [2] ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215–231, 2002.
- [3] HÁGSATER, E.; SOTO ARENAS, M. Á.; SALAZAR CHÁVEZ, G. A.; JIMENEZ MACHORRO, R.; LÓPEZ ROSAS, M. A.; DRESSLER, R. L. **Las orquídeas de México**. Instituto Chinoín, México, D. F. 2005, p. 304.
- [4] KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. **Plant micropropagation in horticultural industries. Proceedings of the Symposium Floriezel**. v. 87, p. 135-141, 1987.
- [5] MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**. v.27, p. 1002-1006, 2003.
- [6] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.473-497, 1962.
- [7] RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias. (**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.
- [8] RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. v. 65, p. 29-35, 2006.
- [9] ROELS, S.; NOCEDA, C.; ESCALONA, M.; SANDOVAL, J.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R.; DEBERGH, P. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.84, p. 155-163, 2006.
- [10] SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.
- [11] TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

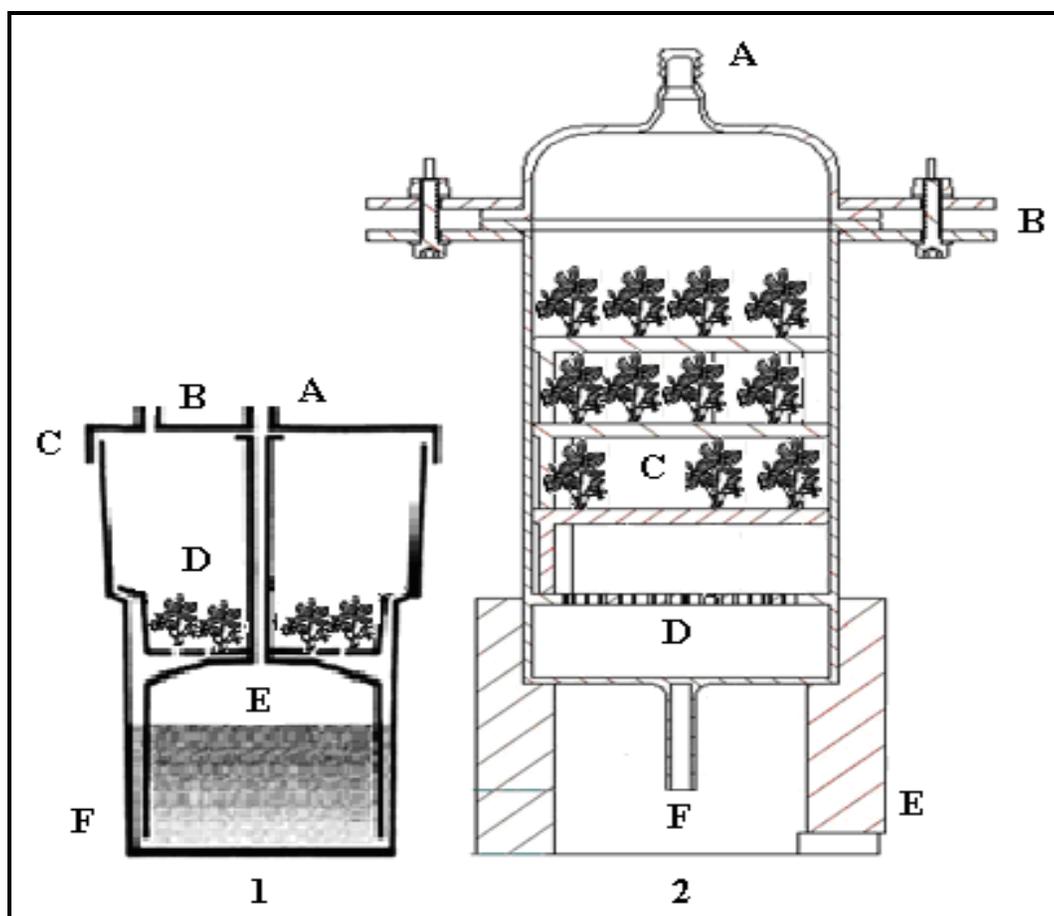


Gráfico 1: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão. (1) RITA®: (A) Entrada de Ar, (B) Saída de Ar, (C) Tampa, (D) Suporte para o cultivo, (E) Base Interna e (F) Frasco (TEISSON & ALVARD, 1995). (2) BIB®: (A) Saída de Ar, (B) Kit Fixação, (C) Estágios, (D) Placa Porosa, (E) Base e (F) Entrada de Ar (SOCCOL et al., 2008).

Tabela 1: Número total de brotos (NTB), massa fresca total (MFT), massa seca total (MS), incremento da massa fresca (IMF), altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR) e comprimento da maior raiz (CMR) de *Oncidium leuochilum* aos 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	NTB	MFT (g)	MST (g)	IMF (x)
BIB®	6,56 a ¹	1,21 a	0,59 a	5,7 a
RITA®	5,13 b	1,17 a	0,49 b	5,1 b
Convencional	5,42 b	1,15 a	0,45 b	4,7 b
Tratamentos	APA (cm)	NR	CR (cm)	CMR (cm)
BIB®	1,87 a ¹	4,86 a	1,54 a	2,21 a
RITA®	1,58 b	4,77 a	1,49 a	2,19 a
Convencional	1,52 b	4,81 a	1,41 b	2,24 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.