
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya bowringiana* O'BRIEN (ORCHIDACEAE) EM DIFERENTES NÍVEIS DE MACRONUTRIENTES E SACAROSE

PALAORO, Geferson Junior¹
SCHMILDT, Omar¹
FERREIRA, Jeferson Pereira¹
FIGUEIREDO, Deleon Demoner Caulyt¹
SCHMILDT, Edilson Romais¹
ALEXANDRE, Rodrigo Sobreira¹

Recebido em: 2016.08.25

Aprovado em: 2018.04.25

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1764

RESUMO: Devido às sementes de orquídeas apresentarem ausência de endosperma e baixa taxa de germinação na natureza e sua propagação por divisão de touceira ser lenta, o cultivo *in vitro* tornou-se uma técnica de propagação rotineira. Entretanto, um grande número de fatores influenciam na germinação e no crescimento *in vitro*, e apesar de ser uma técnica muito difundida, o conhecimento sobre os melhores meios para cultivo ainda são insuficientes. Neste trabalho, objetivou-se estudar o efeito de diferentes níveis de macronutrientes e sacarose no crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana* O'Brien. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, num esquema fatorial de dois tipos de formulações de macronutrientes no meio de cultura Murashige e Skoog (1962), sendo uma concentração padrão completa e outra com a metade dos macroelementos, e cinco níveis de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e posterior teste de Scott-Knott, análise multivariada por Tocher e correlação entre as variáveis. As características avaliadas após seis meses do início do experimento foram: comprimento da parte aérea; número de brotos por plântula; número de raízes por plântula, comprimento da maior raiz e; matéria fresca das plântulas. Constatou-se que o tratamento contendo concentração padrão completa dos macronutrientes do meio MS foi mais eficiente para todas as variáveis avaliadas, sendo os níveis de sacarose que permitiram melhor crescimento das variáveis estudadas foi a de 30 e 45 g L⁻¹. Assim, recomenda-se o uso de MS com 100% dos sais e sacarose a 30 g L⁻¹ para a propagação *in vitro* de *Cattleya bowringiana*.

Palavras-chave: Orquídea. Meios de cultura. Propagação. Cultura de tecidos.

IN VITRO GROWTH OF *Cattleya bowringiana* O'BRIEN (ORCHIDACEAE) IN DIFFERENT LEVELS OF MACRONUTRIENTS AND SUCROSE

SUMMARY: Because the seeds of orchids present absence of endosperm and low rate of germination in nature and their propagation by division of clumps be slow, the *in vitro* cultivation has become a technique of spreading routine. Meanwhile, a large number of factors influence the germination and growth *in vitro*, and despite being a very popular technique, knowledge about the best means for cultivation are still insufficient. In this work, to study the effect of different levels of macronutrients and sucrose on the *in vitro* growth of *Cattleya bowringiana* O'Brien. The experimental design was a completely randomized design with five repetitions, a factorial arrangement of two types of formulations of macronutrients in Murashige and Skoog (1962), being a standard concentration complete and another with half of macroelements, and five levels of sucrose (0 ; 15; 30; 45 and 60 g L⁻¹). The data were subjected to analysis of variance and posterior Scott-Knott test, multivariate analysis by Tocher and correlation between the variables. The characteristics assessed six months after the beginning of the experiment were: shoot length; number of shoots per plantlet; number of roots per plantlet, length of the largest root and; fresh matter of seedlings. It was found that the treatment containing concentration complete pattern of the macronutrients of the MS was more efficient for all variables evaluated, with the levels of sucrose that allowed for a better growth of the variables studied was the 30 and 45 g L⁻¹. Thus, it is recommended the use of MS with 100% of the salts and sucrose to 30 g L⁻¹ for the *in vitro* propagation of *Cattleya bowringiana*.

Keywords: Orchid. Culture media. Propagation. Tissue culture.

¹ CEUNES/UFES

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as mais seriamente ameaçadas de extinção, sendo que a vulnerabilidade resultaria de terem o ciclo de vida altamente especializado, como por exemplo, longo período vegetativo até atingir o período reprodutivo, sementes com pouca ou nenhuma reserva, e a ação do homem por meio da destruição do habitat, além da coleta indiscriminada de orquídeas na natureza (FERREIRA; SUZUKI, 2008).

As orquídeas apresentam crescimento vegetativo vagaroso, 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 (FARIA et al., 2006), além disso, permanecem no estado juvenil por longo período até atingir a maturação, podendo levar de 3 a 10 anos para florescerem (FERREIRA; SUZUKI, 2008). Uma das formas de multiplicação comercial de orquídeas é por meio de sementes; no entanto, é necessário que entrem em contato com um fungo simbiótico ou deve-se proceder à sementeira *in vitro* (FARIA et al., 2010). O cultivo *in vitro*, através da cultura de tecidos, permite acelerar a propagação e elevar a taxa de germinação, o que torna o processo de multiplicação de orquídeas viável.

A obtenção de orquídeas a partir da sementeira *in vitro* é, atualmente, um processo rotineiro, sendo meios de Knudson (1946), Vacin e Went (1949) e Murashige e Skoog (1962) alguns dos mais utilizados (SUZUKI et al., 2010). No entanto, a melhor formulação do meio de cultura para cada espécie, ainda em alguns casos necessita de ajustes na sua composição, e destaca-se ainda o fato que o meio de cultura mais eficaz para a germinação, nem sempre será o meio mais adequado para o crescimento da planta, além disso, as respostas germinativas variam também de uma espécie para outra, não havendo outra opção senão a de estudar a melhor composição nutricional para cada espécie. Estas informações são de grande importância para a otimização do processo de propagação de espécies de orquídeas (SUZUKI et al., 2009; SUZUKI et al., 2010).

A composição do meio de cultura, dentre outros fatores, é importante na promoção do crescimento *in vitro*. Apesar da formulação salina de Knudson (1946) ser a mais utilizada para a propagação *in vitro* de orquídeas, bons resultados têm sido obtidos (SHIMURA; KODA, 2004; SUZUKI et al., 2009; PIVETTA et al., 2010; GALDIANO JÚNIOR et al., 2013a; GALDIANO JÚNIOR et al., 2013b) na utilização do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), normalmente este utilizando a concentração de 30 g L⁻¹. Contudo torna-se necessário determinar a concentração ótima de nutrientes para cada espécie. Sendo assim, as modificações têm sido sugeridas, objetivando maior adaptação das culturas e redução de custos (GEORGE et al., 2008a). Dentre estas modificações cita-se a redução da concentração de macronutrientes que têm sido benéfica no cultivo *in vitro* de algumas espécies de orquídeas como *Oncidium varicosum* (REGO-OLIVEIRA et al., 2003), *Dendrobium nobile* (FARIA et al., 2004) e *Oncidium baueri* (SORACE et al., 2008),

No cultivo *in vitro* tradicional, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos; a melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido) dependem principalmente da espécie vegetal e da fase no processo de propagação *in vitro* (NICOLOSO et al., 2003). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuarem como componente osmótico do meio de cultura (GEORGE et al., 2008b). A sacarose é a fonte de energia mais comumente utilizada nos meios nutritivos, suportando as mais altas taxas de crescimento, na maioria das culturas (JESUS et al., 2011). Vários autores vêm comprovando o efeito positivo da sacarose no cultivo *in vitro* de orquídeas (FRÁGUAS et al., 2003; FARIA et al., 2004; PIVETTA et al.,

2010). No entanto, quantidade elevada de sacarose nos meios de culturas pode reduzir o crescimento das plântulas devido à menor absorção de água e nutrientes em função da redução da pressão osmótica do meio (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013b; GEORGE et al., 2008b) e também pela baixa atividade fotossintética das plântulas, ocasionadas pelo acúmulo de amido, pela inibição da enzima Rubisco (HDIDER; DESJARDINS, 1994) e redução de síntese de clorofila (RODRIGUES et al., 2006; GEORGE et al., 2008b).

Em seu estudo com *Cattleya loddigesii*, Galdiano Júnior et al. (2013b) observa que concentrações mais baixas de sacarose no meio de cultura apresentaram maior eficiência tanto no crescimento *in vitro* quanto na fase de aclimatização de plantas.

Estudos que visem melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são extremamente importantes não apenas para que se possa obter um protocolo de cultivo, mas também para preservá-las e assim evitar sua extinção (SUZUKI et al., 2009). Por isso verifica-se que há necessidade de aprimoramento da técnica de propagação *in vitro* das orquídeas visando disponibilizar mudas em grande quantidade e de alta qualidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos de diferentes níveis de sacarose e macronutrientes no crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana*.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em São Mateus-ES, no período de maio a outubro de 2015.

As flores de *Cattleya bowringiana* O'Brien (Orchidaceae) foram polinizadas artificialmente em ambiente controlado (Casa de vegetação), e as cápsulas fechadas foram coletadas após seis meses, conforme utilizado por Ferreira et al. (2012) para esta espécie. Após a coleta, as cápsulas, fechadas, foram desinfestadas com álcool 70% por cinco minutos e hipoclorito de sódio 4% por 15 minutos, sendo enxaguadas por três vezes consecutivas com água destilada e autoclavada, segundo recomendações de Faria (1998) e abertas na câmara de fluxo laminar. As sementes foram germinadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e as plântulas ao atingirem $10,0 \pm 1,0$ mm de altura, foram subcultivadas em frascos com capacidade de 250 mL, contendo 35 mL de meio de cultura nos diferentes tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, num esquema fatorial 5x2, sendo dois tipos de formulações de macronutrientes no meio de cultura (MS completo e MS com metade dos macronutrientes) e cinco níveis de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹). Cada parcela foi representada por um frasco contendo oito plântulas.

O meio de cultura, em todos os tratamentos, foi suplementado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado, tendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente o meio foi solidificado com ágar marca Vetec® à 7 g L⁻¹ e autoclavado a 120 °C à 1 atm, por 20 minutos.

O transplântio das plântulas para os frascos foi feito em condições assépticas na câmara de fluxo laminar. Em sala de cultivo, os explantes foram mantidos por 180 dias sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxos de fótons fotossintéticos, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 27 ± 2 °C. Ao final do período experimental, foram avaliadas as seguintes características: número de raízes e de brotos por plântula, por meio de avaliação visual; comprimento da maior raiz e da parte aérea, por meio de régua milimetrada e massa fresca total, com o auxílio de uma balança analítica de precisão com quatro casas decimais.

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância, teste de Scott-Knott a 5% para

monovariáveis; teste de Tocher para análise multivariada e correlação de Pearson entre as variáveis. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise de variância, verifica-se que as variáveis número de brotos e de raízes e comprimento da maior raiz foram as mais afetadas pelos fatores sais de MS e sacarose, bem como pela interação entre estes fatores (Tabela 1). No entanto, pela decomposição do fator sacarose dentro de níveis de sais e, de sais dentro de níveis de sacarose, verifica-se que as variáveis comprimento de parte aérea e massa fresca também são afetadas em alguns dos contrastes. Desta forma, embora o fator sacarose seja quantitativo, todas as variáveis foram estudadas pelo teste de média (Tabela 2) e não pela regressão, como preconiza a consolidada literatura da área (STEEL et al., 1997; PIMENTEL-GOMES, 2009), garantindo desta forma maior captação das variâncias de interesse.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA, em mm), número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR, em mm) e massa fresca (MF, em mg) em plântulas de *Cattleya bowringiana* submetidas a meio de cultura contendo dois níveis de sais MS e cinco níveis de sacarose

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		CPA	NB	NR	CMR	MF
Sacarose	4	6,04 ^{ns}	1,53 ^{**}	3,12 ^{**}	307,00 ^{**}	2234,09 ^{ns}
Sais	1	2,69 ^{ns}	1,89 ^{**}	29,67 ^{**}	1146,86 ^{**}	10371,17 ^{**}
Sacarose x Sais	4	4,74 ^{ns}	0,54 [*]	1,66 [*]	127,42 ^{**}	2386,37 ^{ns}
Sacarose/Sais	8	5,39 ^{ns}	1,04 ^{**}	2,39 ^{**}	217,21 ^{**}	2310,23 ^{ns}
Sacarose/(MS)	4	6,88 [*]	1,88 ^{**}	2,28 ^{**}	392,91 ^{**}	3799,80 [*]
Sacarose/(MS/2)	4	3,90 ^{ns}	0,19 ^{ns}	2,50 ^{**}	41,51 ^{ns}	820,66 ^{ns}
Sais/Sacarose	5	4,33 ^{ns}	0,82 ^{**}	7,27 ^{**}	331,30 ^{**}	3983,33 [*]
Sais/0 sacarose	1	4,90 ^{ns}	0,01 ^{ns}	6,77 ^{**}	48,40 ^{**}	300,74 ^{ns}
Sais/15 sacarose	1	5,06 ^{ns}	0,50 ^{ns}	11,30 ^{**}	129,53 ^{**}	266,77 ^{ns}
Sais/30 sacarose	1	4,17 ^{ns}	0,10 ^{ns}	4,89 ^{**}	997,60 ^{**}	6630,63 [*]
Sais/45 sacarose	1	1,81 ^{ns}	3,44 ^{**}	13,23 ^{**}	462,54 ^{**}	12718,50 ^{**}
Sais/60 sacarose	1	10,26 [*]	0,01 ^{ns}	0,14 ^{ns}	18,44 ^{ns}	0,03 ^{ns}
Resíduo	40	2,63	0,18	0,65	31,35	1317,92
Média		11,47	1,67	2,58	15,97	78,53
CV(%)		14,13	25,17	31,20	35,06	46,23

GL = graus de liberdade; CV(%) = coeficiente de variação experimental.

^{ns} não significativo a 5% pelo teste F; *, ** Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Observando-se as médias de comprimento de parte aérea das plântulas ao final de 180 dias de cultivo *in vitro*, verifica-se que o crescimento foi prejudicado na presença de 100% de sais MS com 60 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento da parte aérea, número de brotos, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa fresca em plântulas de *Cattleya bowringiana* submetidas a meio de cultura contendo dois níveis de sais MS e cinco níveis de sacarose

Sais	Sacarose (g L ⁻¹)									
	0		15		30		45		60	
Comprimento da parte aérea (mm)										
MS	11,78	Aa*	12,78	Aa	11,35	Aa	10,55	Aa	9,70	Ba
MS/2	10,38	Aa	12,33	Aa	12,64	Aa	11,40	Aa	11,73	Aa
Número de brotos por plântula										
MS	1,50	Ab	1,70	Ab	1,58	Ab	2,95	Aa	1,58	Ab
MS/2	1,43	Aa	1,25	Aa	1,38	Aa	1,78	Ba	1,53	Aa
Número de raízes por plântula										
MS	2,60	Ab	3,33	Ab	3,57	Aa	4,35	Aa	2,89	Ab
MS/2	0,96	Bb	1,20	Bb	2,18	Ba	2,05	Ba	2,65	Aa
Comprimento da maior raiz (mm)										
MS	10,78	Ab	18,10	Ab	33,08	Aa	26,15	Aa	15,78	Ab
MS/2	6,28	Aa	10,90	Ba	13,10	Ba	12,55	Ba	13,06	Aa
Massa fresca por plântula (mg)										
MS	64,07	Ab	73,46	Ab	109,43	Aa	131,75	Aa	85,98	Ab
MS/2	53,10	Aa	63,13	Aa	57,93	Ba	60,43	Ba	86,08	Aa

Sais: MS = com 100% de sais Murashige e Skoog (1962); MS/2 = com 50% de macro de Murashige e Skoog (1962).

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas para cada variável não diferem estatisticamente a 5% pelo teste F; médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente a 5% pelo teste de Scott-Knott.

Araújo et al. (2007) ao avaliarem o efeito da sacarose na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* obteve maior comprimento da parte aérea em meio WPM com 15 g L⁻¹ de sacarose, já Galdiano Júnior et al. (2013a) observaram que os meios de cultura acrescidos de sacarose entre 20 e 30 g L⁻¹ foram mais eficientes para o crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea*, em meio MS. Quantidades inferiores ou superiores a 20 e 30 g L⁻¹ propiciaram redução no crescimento, sendo a concentração de 26,84 g L⁻¹ a que apresentou melhor resultado na parte aérea.

Galdiano Júnior et. al. (2013b) Ao trabalharem também com *Cattleya loddigesii* verificaram que o meio de cultura acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose apresentou a maior eficiência em seu crescimento, As plântulas apresentaram maior média constatada para a concentração de 20 g L⁻¹ de sacarose quanto ao número de raízes, enquanto proporcionaram comprimento da maior raiz na concentração 23 g L⁻¹ do mesmo carboidrato, Para o comprimento da parte aérea foi verificada maior média para a concentração de 21,5 g L⁻¹.

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, objetivando o melhor crescimento das plântulas e redução de custos (GEORGE et al., 2008a). A utilização do meio de cultura MS com redução da concentração de sais pela metade apresentou bom crescimento em plântulas de *Oncidium varicosum* (REGO-OLIVEIRA et al., 2003), *Dendrobium nobile* (FARIA et al., 2004), *Oncidium baueri* (SORACE et al., 2008) e *Cattleya walkeriana* (DIGNART et al., 2009).

Para, a variável número de brotos, as maiores médias foram alcançadas no tratamento contendo meio MS com 100% de sais, com adição de 45 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2). Guimarães et al. (1999), trabalhando com *Nephrolepis exaltata* verificaram os melhores resultados com níveis menores de sacarose entre 15 e 30 g L⁻¹.

Dignart et al. (2009) trabalhando com *Cattleya walkeriana* com níveis de sacarose entre 15 e 30 g L⁻¹, não observaram diferenças significativas entre as concentrações para número de brotos, contudo,

quando esse carboidrato foi omitido do meio, a brotação foi prejudicada. Resultados diferentes foram obtido por Faria et al. (2004) em plântulas de *Dendrobium nobile*, ao utilizarem meio MS com 50% de microelementos, não encontrando diferença estatística entre as médias das concentrações de sacarose, que variaram de 5 até 60 g L⁻¹.

Com relação ao número de raízes, os melhores tratamentos foram com uso de 100% sais MS combinados com sacarose a 30 ou 45 g L⁻¹, proporcionando a formação 4 raízes por plântula em média (Tabela 2) este resultado está de acordo com Araujo et al. (2007) que ao avaliarem o efeito de sacarose na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* obtiveram maior enraizamento em meio com 45 g L⁻¹ de sacarose, o mesmo foi observado por Sorace et al. (2008), com *Oncidium baueri*, no qual o comprimento e número de raízes foram crescentes e maiores na concentração 40 g L⁻¹.

A concentração de 30 g L⁻¹ também apresentou melhor resultado para o número de raízes de *C. walkeriana* (DIGNART et al. 2009). Houve formação de apenas uma raiz por plântula em meio com apenas metade dos macro de MS na ausência de sacarose. Pivetta et al. (2010) verificaram o efeito positivo da sacarose no número de raízes de *Caularthron bicornutum* com concentrações menores, de 20 e 30 g L⁻¹. Novamente o meio MS completo proporcionou melhores resultados, quando comparado com o meio MS 1/2. Resultados contrários foram obtidos por Rego-Oliveira e Faria (2005) trabalhando com *Catesetum fimbriatum* e Sorace et al. (2008) com plântulas de *Oncidium baueri*, em que o maior número de raízes foi conseguido com a utilização do meio MS ½ de micronutrientes.

A resposta para o comprimento da maior raiz foi superior na utilização do meio MS completo, com a concentração de sacarose de 30 e 45 g L⁻¹, o que proporcionou o comprimento médio de aproximadamente 30 mm (Tabela 2).

Os resultados do presente estudo ratificam os de Besson et al. (2010) e Dignart et al. (2009), observados em *Miltonia flavescens* e *Cattleya walkeriana* respectivamente, nos quais resultados semelhantes foram observados com a utilização de 30 g L⁻¹ sacarose. O aumento da concentração de sacarose, acima de 30 g L⁻¹, valor considerado ideal para a propagação *in vitro* de diversas espécies vegetais (TRIGIANO; GRAY, 2000), prejudicou o crescimento das raízes, ficando estas com tamanhos inferiores. Moreira et al. (2007) verificaram aumento no comprimento das raízes das plântulas de *Laelia purpurata* x *Cattleya warneri*, nas concentrações de sacarose entre 15 e 20 g L⁻¹, já Dignart et al. (2009) não observaram diferença significativa no crescimento das raízes nas concentrações entre 15 e 30 g L⁻¹. Entretanto Galdiano Júnior et al. (2013a) avaliando *Cattleya violacea* observaram que o número de raízes e o comprimento da maior raiz apresentaram maiores valores quando as plantas foram utilizadas com as concentrações de 26,67 e 30,49 g L⁻¹. Diferentemente, Sorace et al. (2008) não verificaram em *Oncidium baueri* diferença estatística para o comprimento da maior raiz, com a utilização do meio MS completo em quaisquer concentrações de sacarose, ao passo que a combinação do meio MS 1/2 com o aumento da concentração de sacarose para 60 g L⁻¹, ocasionou o menor comprimento da maior raiz. O aumento da concentração de sacarose afetou negativamente o enraizamento, provavelmente pela redução do potencial osmótico do meio, fator sabidamente conhecido como inibidor do desenvolvimento radicular, devido à redução na absorção de água e nutrientes pelas plântulas (MALDANER et al., 2006; GEORGE et al., 2008b).

A sacarose contribui com cerca de 50 a 80% do potencial osmótico do meio (TRIGIANO; GRAY; 2000). Especificamente para o meio MS completo, a sacarose a 3% contribui com 50% do total do potencial osmótico do meio, qual seja, -0,223 MPa e este potencial cai para -0,461 MPa quando a sacarose é adicionada ao meio a 6% (GEORGE et al., 2008b). Daí a importância de se utilizar concentrações de sacarose que não prejudiquem a taxa de divisão celular e o conseqüente crescimento das plântulas.

Para a variável massa da matéria fresca, o meio de cultura MS completo proporcionou maiores médias em relação ao meio com 50% dos macro de MS na presença de 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2). Esta média foi de cerca de 110 a 132 mg plântula⁻¹, o dobro da massa da matéria fresca apresentada pelas plântulas em meio com 50% de sais MS com 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose. Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Sorace et al. (2008), obtiveram bom crescimento *in vitro* de massa de matéria fresca total de orquídea *Oncidium baueri* ao reduzirem em 50% a concentração de sais MS na presença de 40 g L⁻¹ de sacarose, já Galdiano Júnior et al. (2013a) avaliando *Cattleya violacea* observaram maior valor da massa fresca das plantas com a utilização de 24,14 g L⁻¹ de sacarose concentração semelhante foi encontrada por Pivetta et al. (2010) para a orquídea amazônica *Caularthron bicornutum*.

Neste trabalho, os resultados encontrados inerentes ao crescimento das plântulas, para o número de brotos e de raízes, comprimento da maior raiz e massa de matéria fresca da parte aérea em relação aos níveis de sacarose utilizados no meio de cultura MS completo, mostra que a ideal é de 30 e 45 g L⁻¹ para a espécie estudada, enquanto que os valores de 15 e 60 g L⁻¹ foram prejudiciais ao crescimento. De acordo com estes resultados, além dos fatores já discutidos anteriormente, sugere-se que o excesso de sacarose no meio de cultivo impediu das plântulas terem melhor crescimento *in vitro* devido possivelmente a baixa atividade fotossintética das plântulas, ocasionadas pelo acúmulo de amido e à inibição da enzima Rubisco (HDIDER; DESJARDINS, 1994) e redução de síntese de clorofila (RODRIGUES et al., 2006), enquanto que a menor concentração de sacarose utilizada, sozinha não foi suficiente para estimular a autotrofia das plântulas, o que pode ser feito com o aumento da intensidade de luz, e melhoria na troca de gases nos frascos de cultura.

Diante dos resultados apresentados de estudo de cada variável isoladamente, verifica-se que as melhores respostas oscilaram para as diferentes variáveis. Considerando que desta forma, não se consegue eleger o melhor tratamento, procedeu-se à análise multivariada pelo método de Tocher. Por este método, os tratamentos foram agrupados de acordo com a semelhança de resposta na análise das cinco variáveis de estudo simultaneamente. Assim, como demonstrado na Tabela 3, foram formados dois grupos, em que destaca-se o grupo 2 em que foram agrupados os tratamentos contendo 100% de sais MS combinados com sacarose a 30 e 45 g L⁻¹. Como estas combinações apresentaram as maiores médias para as variáveis em estudo, recomenda-se que para a multiplicação de *Cattleya bowringiana* seja usado MS completo com sacarose a 30 g L⁻¹.

Tabela 3. Agrupamento pelo método de Tocher de tratamentos no cultivo *in vitro* de *Cattleya bowringiana* submetidas à meio de cultura contendo dois níveis de sais MS e cinco níveis de sacarose

Grupos	Tratamentos (MS, em proporção dos macronutrientes + Sacarose, em g L ⁻¹)
I	(MS/2 + 0); (MS/2 + 15); (MS/2 + 30); (MS/2 + 45); (MS/2 + 60); (MS + 0); (MS + 15); (MS + 60)
II	(MS + 30); (MS + 45)

Na Tabela 4 apresentamos os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas. Nota-se que a variável comprimento de parte aérea não apresentou correlação significativa com nenhuma das outras variáveis estudadas.

Tabela 4. Correlação de Pearson (r) entre as variáveis comprimento da parte aérea (CPA, em mm), número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR, em mm) e massa fresca (MF, em mg) em plântulas de *Cattleya bowringiana* submetidas a meio de cultura contendo dois níveis de sais MS

Variáveis	r	Variáveis			
		NB	NR	CMR	MF
CPA	MS	-0,20 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,10 ^{ns}
	MS/2	0,18 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,17 ^{ns}
NB	MS		0,38 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,58 ^{**}
	MS/2		0,22 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,19 ^{ns}
NR	MS			0,61 ^{**}	0,77 ^{**}
	MS/2			0,77 ^{**}	0,56 ^{**}
CMR	MS				0,62 ^{**}
	MS/2				0,59 ^{**}

r: os coeficientes de correlação de Pearson ($H_0 : \rho = 0$; $H_a : \rho \neq 0$) foram calculados usando-se 25 pares de dados.

Sais: MS = com 100% de sais Murashige e Skoog (1962); MS/2 = com 50% de macro de Murashige e Skoog (1962).

^{ns} não significativo a 5% pelo teste t; ^{**}Significativo a 1% pelo teste t.

A variável número de brotos por plântula apresentou relação positiva e significativa com massa de matéria fresca apenas com uso de 100% sais MS. Este resultado reforça os do teste de média (Tabela 2) que mostraram resposta de ambas variáveis ao uso de sacarose no meio na presença de 100% sais MS e, falta de resposta quando se usou apenas 50% de macro do meio MS. Outras variáveis que contribuíram para aumento da massa de matéria fresca das plântulas foram o número de raízes e o comprimento da maior raiz.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este trabalho de cultivo *in vitro* de *Cattleya bowringiana* utilizando-se sais MS, recomenda-se meio de cultura com 100% destes sais com sacarose a 30 g L⁻¹.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G. et al. Efeito da concentração de sacarose e qualidade de Luz na propagação *in vitro* de plântulas de orquídea. **Plant Cell Culture and Micropropagation**. v.3, n.2, p.96-102, 2007.

BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.1, p.9-13, 2010.

CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *In vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e agrotecnologia**, v.33, n.3, p.780-787, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000300017>

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias, 2010. 208p.

- FARIA, R. T. et al. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, v.22, n.4, p.780-783, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362004000400023>
- FARIA, R. T. et al. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum: Agronomy*, v.28, n.1, p.71-74, 2006.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v28i1.1672>
- FARIA, R. T. Micropropagação de *Dendrobium nobile in vitro*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (eds.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.
- FERREIRA, J. P. et al. Crescimento *in vitro* de orquídea em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio. *Nucleus*, v.9, n.1, p.137-141, 2012.
<http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278.693>
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M. I. B.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. (eds.). **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, 2008. p.67-68.
- FRÁGUAS, C. B. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Revista Ceres*, v.50, n.292, p.719-726, 2003.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. *Acta Amazônica*, v.43, n.2, p.127-134, 2013a. □ □ <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000200001>
- GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.2, p.583-592, 2013b.
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p583>
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture 3rd edition: volume 1. the background**. Dordrecht: Springer, 2008a. p.65-113.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture 3rd edition: volume 1. the background**. Dordrecht: Springer, 2008b. p.115-173.
- 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 Agrotecnologia*, v.23, n.2, p.309-316, 1999.
- HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.36, n.1, p.27-33, 1994.
- JESUS, A. M. S. et al. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. *Revista Ceres*, v.58, n.6, p.679-684, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000600001>
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* v.15, p.214-217, 1946.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000400024>

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. da C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lind. var. *venosa* x *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, v.2, n.2, p.16-21, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000100010>

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15 ed. Piracicaba: Fealq, 2009. 451p.

PIVETTA, K. F. L. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1897-1902, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000153>

REGO-OLIVEIRA, L. V. et al. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.2, p.265-272, 2003.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and comercial fertilizers formulation. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.27, n.1, p.1-5, 2005. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.1901>

RODRIGUES, M. M.; MELO, M. D.; ALOUFA, M. A. I. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.171-173, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000100024>

SHIMURA, H.; KODA, Y. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.273-276, 2004.

SORACE, M. et al. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.4, p.775-782, 2008.
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n4p775>

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3 ed. New York: MacGraw-Hill Book Companies, 1997. 666 p.

SUZUKI, R. M. et al. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v.36, n.4, p.657-666, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062009000400006>

SUZUKI, R. M. et al. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v.37 n.4, p.731-742, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062010000400004>

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. 454 p.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v.110, n.4, p.605-613, 1949.