



GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrobium nobile* LINDL. SEM SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

J. S. Soares^{1*}, L. M. Ribeiro², J. C. Sorgato²

¹ UEMS - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Pós-Graduação em Recursos Naturais - PGRN, Campus de Dourados, MS, Brasil

² UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados, Pós-Graduação em Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias, Dourados, MS, Brasil

Article history: Received 24 October 2017; Received in revised form 30 November 2017; Accepted 04 December 2017; Available online 27 December 2017.

RESUMO

O cultivo *in vitro* de orquídeas possibilita elevadas porcentagens de germinação, quando comparadas a germinação natural dessas espécies, pois suas sementes possuem pouca ou nenhuma reserva nutritiva. Objetivou-se avaliar diferentes volumes de suspensão de sementes na propagação *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. var. *nobilius* e var. *comet king* em meio alternativo, sem subcultivos. Foram utilizadas 0,02 g de sementes de cada planta e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por 15 minutos, sendo diluídas em água estéril até completar 60 mL. Em ambiente asséptico, procedeu-se a semeadura *in vitro*. Foram pipetados 2, 3 ou 4 mL de cada suspensão de sementes em frascos de vidro de 600mL providos de tampa metálica e contendo 80 mL do meio de cultura alternativo. As culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C; 16 horas) permanecendo por seis meses nessas condições. O maior número de sementes potencialmente viáveis (426 mg^{-1}) foi observado em *D. nobile* var. *nobilius*, enquanto *D. nobile* var. *comet king* apresentou 164 mg^{-1} sementes potencialmente viáveis. A variedade *nobilius* apresentou maiores resultados no número de plantas total e de plantas vivas, número de folhas, número e diâmetro de pseudobulbos e comprimento da maior raiz, característica dessa variedade, que é mais vigorosa. A inoculação de 2mL foi mais eficiente para a micropropagação das duas plantas, havendo menos concorrência entre as plântulas no frasco.

Palavras-chave: Inoculação, micropropagação, Orchidaceae.

SEED QUANTITY ON *IN VITRO* CULTIVATION OF *Dendrobium nobile* LINDL. IN ALTERNATIVE CULTURE MEDIA WITHOUT SUBCULTURE

ABSTRACT

The *in vitro* orchid cultivation results in high percentages of germination when compared to the natural germination of these species, because their seeds have few or any nutritional reserves. The objective of this study was to evaluate different amounts of seeds in the *in vitro* propagation of *Dendrobium nobile* Lindl. var. *nobilius* and var. *comet king* in alternative medium, without subcultures. 0.02 g of seeds of each plant were used and disinfested in 0.8% sodium hypochlorite solution for 15 minutes, being diluted in sterile water until 60 mL was reached. In the aseptic environment, *in vitro* seeding was carried out 2, 3 or 4 mL of each seed suspension were pipetted into 600 mL glass vials provided with a metal stopper and containing 80 mL of the alternative culture medium. The cultures were transferred to the growth room with controlled temperature and photoperiod (25 ± 2 °C, 16 hours) remaining for

* jacke.schultz@gmail.com

six months under these conditions. The highest number of potentially viable seeds (426 mg^{-1}) was observed in *D. nobile* var. *nobilius*, while *D. nobile* var. *comet king* showed 164 mg^{-1} potentially viable seeds. The *nobilius* variety showed higher results in the total number of plants and live plants, number of leaves, number and diameter of pseudobulbs and length of the largest root, characteristic of this variety, which is more vigorous. The inoculation of 2mL was more efficient for the micropropagation of the two plants, with less competition between the seedlings in the flask.

Keywords: Inoculation, micropropagation, Orchidaceae.

INTRODUÇÃO

O cultivo comercial de espécies de orquídeas representa atividade com grande importância no agronegócio mundial de flores e plantas ornamentais, movimentando anualmente dezenas de bilhões de dólares (JUNQUEIRA & PEETZ, 2010; ALVES et al., 2013).

O gênero *Dendrobium* é constituído de plantas de fácil cultivo e que florescem em grande escala (MELLO & PANTOJA, 2014). Dentre suas espécies destaca-se o *Dendrobium nobile* Lindl., que é originária da China e do Himalaia, amplamente cultivada e comercializada no Brasil, destacando-se no mercado das plantas de corte e envasadas (ASSIS et al., 2010; ROSA et al., 2014; SORGATO et al., 2015a). Além do aspecto ornamental e valor comercial na floricultura, esta orquídea é muito utilizada na tradicional medicina chinesa por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-tumoral e anti-mutagênica (LORENZI, 2013; LAM et al., 2015).

Diferente da maioria das famílias botânicas, as sementes de Orchidaceae não possuem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação. Desta forma, na natureza, as sementes germinam em simbiose com fungos micorrízicos. Nesse sentido, a produção de orquídeas *in vitro* é

importante, pois possibilita um grande número de mudas em pequeno espaço físico, pouco tempo de cultivo e com elevada qualidade sanitária (FARIA et al., 2012; ABRÃO et al., 2014).

Entre os fatores que interferem na eficiência da micropropagação estão a composição dos meios nutritivos, os reguladores de crescimento, a condição de luminosidade, os tratamentos pré-germinativos, o número de subcultivos e o número de indivíduos por frasco de cultivo (SOARES et al., 2008; KUHN et al., 2014; SILVA et al., 2015).

No processo de semeadura *in vitro*, o volume da suspensão de sementes inoculado associado à sua viabilidade pode influenciar o sucesso desse procedimento, uma vez que, a superpopulação de indivíduos no frasco de cultivo, quando não realizado o subcultivo, pode ocasionar o esgotamento das reservas nutritivas dos meios de cultura ocasionando o lento desenvolvimento ou a morte das estruturas vegetais formadas.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes volumes de inoculação de sementes no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* var. *nobilius* e de *Dendrobium nobile* var. *comet king*, sem subcultivos, em meio de cultura alternativo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Foram utilizadas sementes de *Dendrobium nobile* Lindl. var. *nobilius* e var. *comet king* provenientes de cápsulas produzidas mediante autopolinização manual e colhidas 12 meses após a

identificação visual da formação do fruto. Após a assepsia com álcool etílico 70%, as cápsulas foram abertas e, 0,005 g de sementes submetidas ao teste de tetrazólio para determinação da viabilidade. Foram identificadas 164 sementes viáveis mg^{-1} para a variedade *comet king* e 426 sementes viáveis mg^{-1} para a variedade *nobilis*. Após a confirmação da viabilidade procedeu-se a semeadura *in vitro*.

Foi utilizado meio de cultura proposto por Campos (2002), modificado por adição de 70 g de tomate tipo italiano sem sementes e casca, 50 g de banana nanica sem casca, 3 mL de fertilizante NPK 10-10-10, 7 g de ágar bacteriológico, 25 g de sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 150 mL de água de coco, 3 g de carvão ativado e água destilada até completar um litro.

O pH foi ajustado para 5,8 (KOH1,0 M) após homogeneização do meio no liquidificador. Posteriormente 80 mL do meio de cultura foram transferidos para frascos de 600 mL providos de tampa metálica, sendo, a seguir, esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 °C e uma atmosfera de pressão. Na sequência, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico para realização da semeadura *in vitro*.

Para a semeadura *in vitro*, foram pesadas separadamente 0,01 g de sementes de cada variedade estudada. As sementes foram desinfestadas por 15 minutos em solução a 0,8% de hipoclorito de sódio comercial (CAMPOS, 2002). Decorrido este tempo a suspensão foi diluída para 50 mL com água destilada estéril e, em ambiente asséptico, procedeu-se a semeadura utilizando pipetador automático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo da interação entre as variedades e o volume de inoculação sobre a maioria das variáveis estudadas. O resumo das análises de variância e a média geral das variáveis, bem como a significância ou não dos

Em cada frasco de cultivo inoculou-se 2, 3 ou 4 mL de uma das suspensões de sementes, com quatro repetições constituídas de três frascos cada. Os volumes de inoculação (2, 3 ou 4 mL) corresponderam, na variedade *nobilis*, a 170, 256 e 341 sementes por frasco de cultivo e, na variedade *comet king* a 66, 98 e 131 sementes, respectivamente.

Após a semeadura, os frascos, devidamente tampados, foram alocados em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C, 16 h, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Seis meses após a semeadura, as plântulas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto ao número de plântulas vivas (PV) e mortas (PM), calculando-se a porcentagem de germinação (%G) e de sobrevivência (%SOB), por meio das expressões:

$$\%G = [(PV + PM) / N^{\circ} \text{ sementes inoculadas}] \times 100$$

$$\%SOB = [PV / (PV+PM)] \times 100$$

Após a completa remoção do substrato, as plântulas vivas foram avaliadas quanto ao número de pseudobulbos e de folhas, diâmetro dos pseudobulbos e comprimento da maior raiz.

Como delineamento experimental, foi utilizado DIC com tratamentos arranjados em esquema fatorial 2x3 (duas variedades de *D. nobile* e três volumes de inoculação) com 4 repetições. Após a ANOVA, as médias foram submetidas à análise de regressão até o nível de 5 % de probabilidade, com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

fatores analisados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação (%G) e da sobrevivência (%SOB), do número de plântulas (NP), de folhas (NF), de pseudobulbos (NB), diâmetro dos pseudobulbos (DB) e comprimento da maior raiz (CR) de *Dendrobium nobile* var. *nobilius* e var. *comet king*. UFGD, Dourados-MS, 2017.

F.V.	GL	Quadrados médios						
		%G	%SOB	NP	NF	NB	DB	CR
Variedade	1	1,54*	201,15**	131,93**	2,45**	95,40**	11,60**	153,85**
Volume	2	0,03 ^{ns}	56,13**	27,24**	1,19**	29,59**	1,80**	18,38**
Var. x Vol.	2	0,078 ^{ns}	46,83**	2,36*	0,39**	36,80**	1,19**	4,50**
Resíduo	18	0,29	0,28	0,65	0,02	0,60	0,01	0,17
C.V.(%)		6,0	7,7	7,1	8,9	5,42	1,23	9,2
Média		79,6%	62,6%	136,3	2,0	1,1	2,6mm	28,0mm

** significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

A porcentagem de germinação (%G) de ambas as variedades foi superior a 70% em todos os volumes de inoculação testados, com %G média de 79,6 (Tabela 1). De maneira geral, no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile*, porcentagens de germinação em torno de 75% são consideradas comercialmente satisfatórias (SORGATO et al., 2015a), já que em ambiente natural essa porcentagem é baixa, em torno de 2 a 3% (CORRIE & TANDON, 1993).

Ao analisar a Figura 1A, observa-se que, para a var. *comet king*, a menor %G calculada (77,7%) ocorreu quando o volume de suspensão de sementes inoculado foi de 3,06 mL. Quanto à porcentagem de sobrevivência (%SOB), o menor valor calculado (%SOB = 0%) foi encontrado com a inoculação de 3,67 mL e o maior (%SOB = 100%) quando se utilizou 1,54 mL de suspensão de sementes. A %SOB da variedade *comet king* foi de 94% quando utilizado o volume

de 2 mL, entretanto, para os volumes de inoculação 3 e 4 mL, não houve sobrevivência das plantas ao final do período experimental, o que permite inferir que a superpopulação de plantas induziu maior competição pelos nutrientes, esgotando o meio e ocasionando a morte dos indivíduos. *Comet king* sobrevive sem subcultivos por seis meses quando o número de plantas por frasco de cultivo for inferior ou igual a 60 plântulas (Figura 1B).

Na figura 2A, a maior %G calculada da var. *nobilius* (%G = 82,58%) foi encontrada no volume inoculado de 2,92 mL. A menor %SOB calculada (%SOB = 0%) ocorreu com o volume de 15,75 mL e a maior (%SOB = 100%) quando utilizado 2,14 mL.

Após 6 meses de cultivo *in vitro*, a %SOB dessa variedade foi superior a 80% em todos os volumes de suspensão de sementes utilizados.

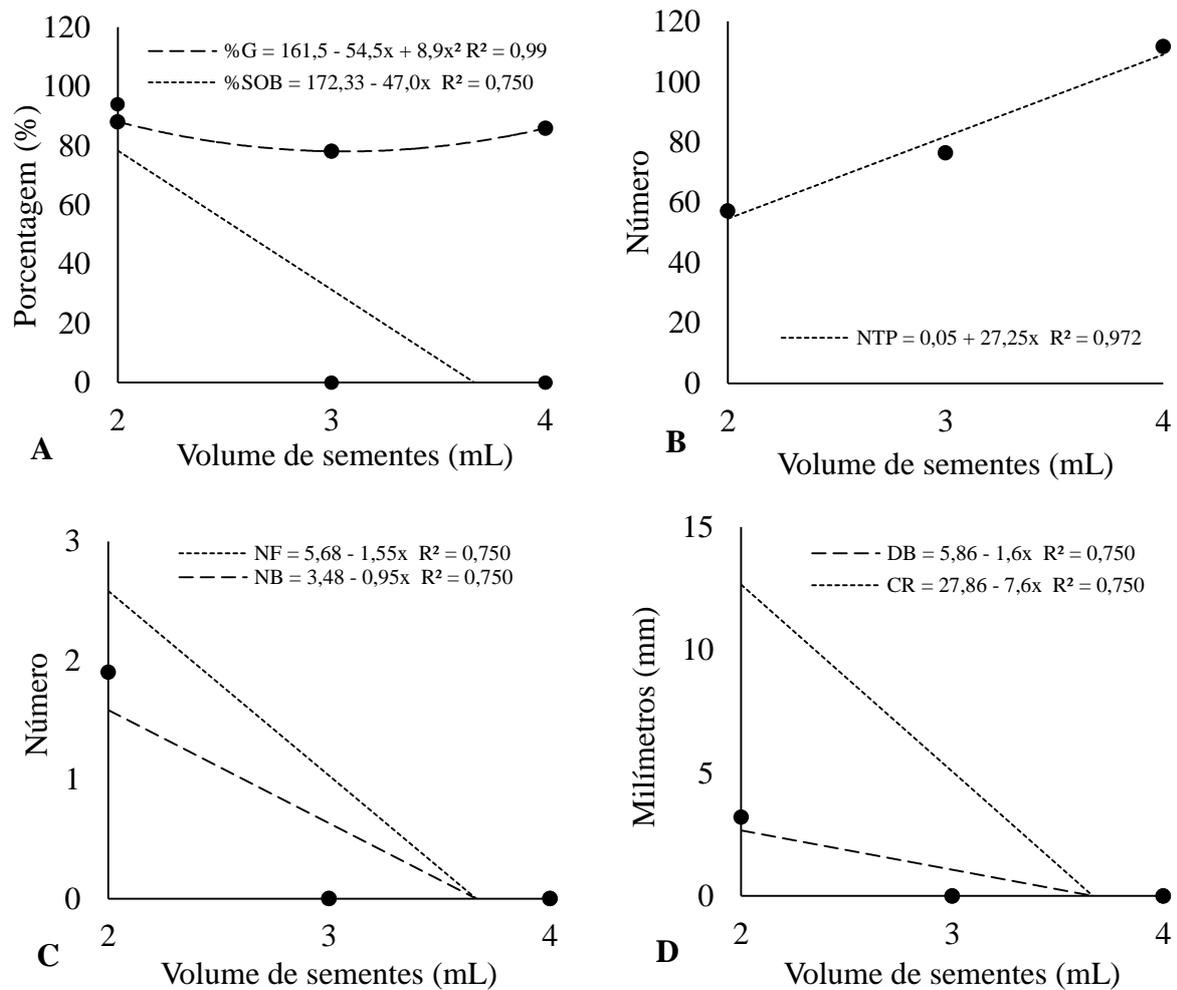


Figura 1. Valores das porcentagens de germinação (%G) e de sobrevivência (%SOB) (A), número total de plântulas (NTP) (B), de número de folhas (NF) e de pseudobulbos (NB) (C), diâmetro dos pseudobulbos (DB) e comprimento da maior raiz (CR) (D) de *Dendrobium nobile* var. *comet king*. UFGD, Dourados-MS, 2017.

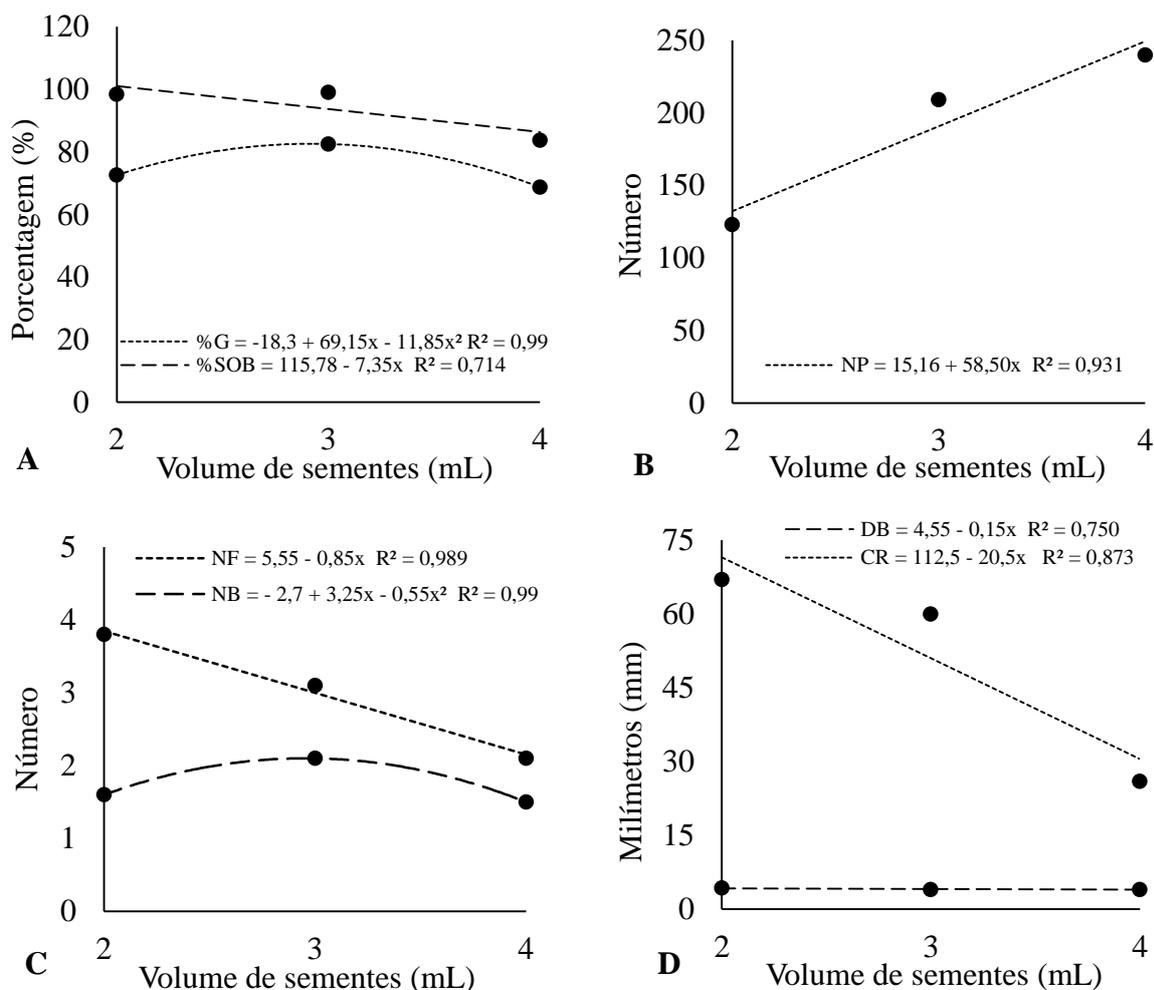


Figura 2. Valores das porcentagens de germinação (%G) e de sobrevivência (%SOB) (A), número total de plântulas (NTP) (B), de número de folhas (NF) e de pseudobulbos (NB) (C), diâmetro dos pseudobulbos (DB) e comprimento da maior raiz (CR) (D) de *Dendrobium nobile* var. *nobilius*. UFGD, Dourados-MS, 2017.

A utilização de 2 mL da suspensão de sementes produziu menor número de plântulas (123,5) da variedade *nobilius*, entretanto, com maior número de folhas (3,8) e maior sistema radicular (67,0 mm) (Figuras 2B, 2C e 2D). A redução da competição por luz, nutrientes e espaço, culminando no aumento do crescimento de plantas foi relatada por Jorge et al. (2015), os quais verificaram que uma menor quantidade de sementes germinadas, acarretando em menos plantas por frasco, aumentou o crescimento destas.

As variáveis citadas são essenciais à fase de aclimatização *ex vitro*, pois as plantas passarão da condição heterotrófica para autotrófica (ASSIS et al., 2010). Nessa nova condição, a presença das folhas

é fundamental para a fotossíntese e fotorrespiração o que, juntamente com pseudobulbos mais desenvolvidos (DB = 4,3 mm), que são órgãos de reserva nutricional e de água, pode fazer a diferença entre a sobrevivência ou não das plantas.

Em relação ao sistema radicular das plantas estudadas, os maiores comprimentos de raiz foram observados para as duas variedades com a utilização de 2 mL (67,0 mm para *nobilius* e 15,2 mm para *comet king*) (Figuras 1D e 2D). Plântulas com sistema radicular mais desenvolvido são mais capazes de sobreviver à fase de aclimatização *ex vitro*, pois o sistema radicular das orquídeas, além da função de nutrição tem também a

finalidade de fixar as plantas no substrato (SORGATO et al., 2015b). Os resultados observados nesse trabalho, em relação ao comprimento das raízes, permitem inferir que a variedade *nobilius* poderá ter maior facilidade de aclimatização *ex vitro* do que a *comet king*.

Os resultados observados neste trabalho demonstram que um menor número de plantas por frasco de cultivo contribuiu tanto para o aumento da parte aérea das plantas quanto para o aumento do sistema radicular destas. Já Soares et al. (2008), estudando as orquídeas *Cattleya persivaliana* e *C. loddigesii*, relataram que a utilização de menos explantes (3) por

frasco propiciou maior crescimento da parte aérea, enquanto que a utilização de um maior número (12 explantes) propiciou o crescimento do sistema radicular.

Os resultados relativos ao crescimento das plântulas demonstram que, mesmo a utilização de 2 mL de suspensão de sementes, que corresponderam à 0,0004 g de sementes das variedades estudadas, produziu número elevado de plântulas por frasco, o que pode ter comprometido o crescimento *in vitro*, já que não foram realizados subcultivos, que tem o objetivo de minimizar os efeitos da competição que se estabelece dentro do frasco de cultivo (STANCATO et al., 2001).

CONCLUSÃO

Quando não realizados subcultivos, o volume de 2 mL de suspensão de sementes é o mais indicado para a semeadura *in vitro*

das variedades *nobilius* e *comet king* da espécie *Dendrobium nobile* Lindl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. C. R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; DE MELO FERREIRA, W.; SUZUKI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.(Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12 (3):141-147, 2014.

ALVES, A. P.; SAPATINI, J. R.; SOUZA-LEAL, T.; FERNANDES, F. S.; MORAES, C. P. Influência da poda radical e recipientes na aclimatização *ex vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11 (4): 414-418, 2013.

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

CAMPOS D, M. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.

CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. Through high frequency conversion of encapsulated

protocorms under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31(1): 61-64, 1993.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012. 124 p.

JORGE, J.; JURAS, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13(3): 134-141, 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 16(1): 79-81, 2010.

KUHN, B. C.; CLAUDINO, L. O.; KUHN, S. B.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Micropropagação de *Cattleya forbesii* Lindley (Orchidaceae) usando

combinações de auxina e citocinina.

Revista Pleiade, v. 14(8): 73-82, 2014.

LAM, Y.; NG, T. B.; YAO, R. M.; SHI, J.; XU, K.; SZE, S. C. W.; ZHANG, K. Y. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015(1): 01-25, 2015.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: Herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2013. 1120p.

MELLO, A. C. F.; PANTOJA, S. C. S. Orquídeas no paisagismo da área urbana de Ipanema-RJ. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 18 (18): 87-108, 2014.

ROSA, Y. B. C. J.; RAMOS, F. Z.; SOUZA, R. G.; SOARES, J. S.; ROSA JUNIOR, E. J.; HOFFMANN, N. T. K.; ROSA, D. B. C. J.; SORGATO, J. C. Influência da luminosidade no crescimento e floração de *Dendrobium nobile* Lindl. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20 (1): 79-86, 2014.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.;

RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34(10): 1685-1706, 2015.

SOARES, J. D. R., RODRIGUES, F. A., DE ARAUJO, A. G., PASQUAL, M., DE ASSIS, F. A. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes. **Ceres**, v. 55(1): 49-53, 2008.

SORGATO, J.C.; ROSA, Y. B. C. J.; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUSA, G. G. D. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v. 45(2): 231-237, 2015b.

SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; PINTO, J. V. C.; ROSA, Y. B. C. J. Potencial germinativo de sementes e qualidade de keikis de *Dendrobium nobile* em diferentes fases do desenvolvimento dos frutos. **Ciência Rural**, v. 45(11): 1965-1971, 2015a.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.17(1): 25-33, 2001.