



NOTA CIENTÍFICA

Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes

Cristiano Pedroso de Moraes^{1,2*}, José Alberto Diogo³, Rosângela Isete Canabrava³, Natália Pierobon Pedro³, Ana Luiza Fonseca Fortes Furtado^{3,4} e Marco Aurélio Marteline¹

Submetido: 30 de julho de 2009

Recebido após revisão: 14 de janeiro de 2010

Aceito: 26 de janeiro de 2010

Disponível on-line: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1324>

RESUMO: (Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes). Comercialmente, o cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. é de grande importância para o agronegócio florícola mundial, mas seu lento desenvolvimento contribui para o elevado valor unitário da planta no mercado. A propagação massal via sementeira *in vitro* constitui ferramenta indispensável para propagação das principais espécies de orquídeas comerciais. O tipo de frasco e a quantidade de meio de cultura utilizados são variáveis que têm merecido pouca atenção, embora afetem diretamente a área superficial da interface meio de cultura-atmosfera, a profundidade e o volume de ar sobre o meio de cultura, sendo que o emprego do recipiente ideal para cada espécie pode otimizar sua velocidade de produção. O presente trabalho objetivou avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *D. nobile* em recipientes de diferentes tamanhos, contendo o mesmo volume de meio de cultura MS (30 mL). Sementes de *D. nobile* foram inoculadas em frascos de 100 mL, 200 mL e 400 mL e cultivadas em BOD por 180 dias. Os resultados demonstraram que o desenvolvimento de plântulas de *D. nobile* foi promovido pelo uso de frascos de 100 mL, os quais podem ser utilizados para propagação comercial.

Palavras-chave: cultura *in vitro*, orquídea, agronegócio, propagação de plantas.

ABSTRACT: (*In Vitro* development of *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) in vessels of different volumes). Commercial cultivation of *Dendrobium nobile* Lindl. is of great importance to the agribusiness floricultural world, but the slow development of the plant contributes to the high unit value of the plant in the market. The massal propagation through sowing seeds *in vitro* is an important method for propagation orchid commercial species. The type of the flasks and the amount of culture medium used are variables that have received little attention although they directly affect the superficial area of the medium-air culture interface, depth, volume of air over the culture medium, and the identification of the ideal vessels for each species can optimize the production. The present study aimed to evaluate the *in vitro* development of *D. nobile* seedlings in different size vessels, each containing the same volume of MS culture (30 mL). *D. nobile* seeds were inoculated in flasks of 100 mL, 200 mL, and 400 mL and cultivated in BOD for 180 days. The results showed that the development of the *D. nobile* seedlings was promoted by the use of 100 mL-flasks, which could then be used for commercial propagation.

Key words: *in vitro* culture, orchid, agribusiness, plant propagation.

INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam desenvolvimento lento, requerendo assim, maior período de cultivo antes de serem comercializadas. Isso tem contribuído para o elevado valor unitário de suas plantas no mercado, o que acarreta em grande interesse na diminuição do tempo de formação de mudas de orquídea, principalmente, para a diminuição dos custos de produção (Vichiato *et al.* 2007).

Comercialmente, o cultivo de espécies do gênero *Dendrobium* é de grande importância para o agronegócio florícola mundial, devido, principalmente, a ampla capacidade de recombinação genética e de características como beleza, forma, tamanho e durabilidade de suas flores, o que torna a espécie *Dendrobium nobile* Lindl. e suas cultivares, plantas muito utilizadas na obtenção de híbridos de alto valor comercial e que apresentam liderança no comércio mundial de orquídeas envasadas e de corte (Moraes *et al.* 2002).

Dendrobium nobile apresenta-se como espécie epi-

fito nativa da Birmânia, Índia, Tailândia e Indochina e caracteriza-se por apresentar pseudobulbos eretos de até 40 cm de altura de onde surgem inflorescências com até três flores nos nós de suas metades superiores. As flores possuem em média 3 cm de diâmetro e apresentam matizes cor-de-rosa-purpúreo na base do labelo, motivo pelo qual a espécie é denominada popularmente como “Olho de Boneca” (Vichiato *et al.* 2007).

Convencionalmente, esta espécie é propagada pela separação de rizomas ou por meio de pseudobulbos excisados, técnicas que resultam em baixa taxa de proliferação (Nayak *et al.* 2001). Uma das ferramentas indispensáveis à propagação da espécie é a sementeira *in vitro* (Moraes *et al.* 2002), uma vez que as metodologias empregadas proporcionam a produção de plantas saudáveis, velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, maior produção em menor tempo e espaço físico e a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos (Santos *et al.* 2006).

1. NUCIA, Núcleo de Ciências Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS. Avenida Maximiliano Baruto 500, CEP 13607-339, Araras, SP, Brasil.

2. Doutorando do Depto. de Botânica, IBUNESP, Rio Claro. Caixa Postal 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

3. Aluno de Graduação em Bacharelado e Ciências Biológicas do Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS. Araras, SP, Brasil.

4. Doutora em Hidráulica e Saneamento EESC/USP. Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS. Araras, SP, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: pedroso@uniararas.br

O cultivo *in vitro* de orquídeas tem sido utilizado no Brasil para aumentar a produção de mudas de alta qualidade genética e para redução de custo de produção pela simplificação de meios de cultura (Stancato *et al.* 2001). Como exemplo, podemos citar os resultados obtidos por Park *et al.* (2002), na micropropagação de espécies de orquídeas do gênero *Phalaenopsis* pela utilização do fertilizante comercial Hyponex de fórmula 20-20-20 (NPK), que proporcionou o mínimo de 62% de sobrevivência de portocórmios por frasco.

As informações relacionadas à influência do tamanho de frascos na germinação e desenvolvimento de plantas *in vitro* são praticamente inexistentes na literatura científica, mesmo existindo evidências de que, em diferentes espécies, os recipientes de diferentes tamanhos afetam a área superficial sobre o meio de cultivo (Buffa Filho *et al.* 2002).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas germinadas de *D. nobile* em recipientes de mesmo formato e diferentes tamanhos, contendo o mesmo volume de meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, cinco flores de plantas diferentes da espécie *D. nobile* foram autopolinizadas artificialmente em setembro de 2008. Seis meses após a autopolinização, sementes foram coletadas dos frutos maduros, homogeneizadas e levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto, Uniararas.

Para a semeadura, foi utilizado meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), com pH ajustado para 6 antes da adição de 7 g.L⁻¹ de agar-banana. Trinta mL de meio foram vertidos em frascos de 100 mL, de 200 mL e de 400 mL, os quais foram autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão, durante 20 min para esterilização (Arditti & Ernest 1992). As sementes foram desinfestadas utilizando solução de hipoclorito de sódio (5%, v/v), e 1 g de sementes foi submetido à agitação na solução durante 5 minutos em tubos de microcentrífuga (1,5 mL). Posteriormente, os tubos foram mergulhados em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada, com o auxílio de seringa (1 mL). Ainda utilizando a seringa, as sementes, juntamente com 1 mL de água destilada, foram depositadas nos frascos contendo os meios de cultura (Arditti & Ernest 1992). Após a semeadura, os frascos contendo as sementes foram mantidos em câmara BOD

(MA 403), em temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de aproximadamente 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por 180 dias.

Os parâmetros de desenvolvimento de plântulas foram analisados em cinco plantas/frasco, utilizando-se quatro frascos por tratamento (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009). Foram avaliados os parâmetros de comprimento total da plântula, número de raízes, número de folhas, massa fresca da plântula inteira, massa seca da plântula inteira, comprimento da maior raiz e comprimento da maior folha, utilizando-se de paquímetro digital (Digimess 100A) e balança analítica (Gehaka BG 400). Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste de Liliefors para normalidade dos resíduos da ANOVA. Como essa suposição foi atendida para todas as medidas analisadas ($p < 0,01$), a análise de variância (ANOVA) foi realizada e as médias separadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). As variáveis também foram submetidas à análise por regressão linear pela utilização do aplicativo BioEstat 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estabelecimento e a multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* estão sujeitos à influência de diversos fatores, sendo que a combinação adequada de todas essas variáveis proporciona o sucesso da propagação para cada espécie. As concentrações dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultura, bem como a temperatura e fotoperíodo, são os fatores que mais variam entre as técnicas utilizadas para a micropropagação. Outras variáveis, como a utilização de agentes geleificantes dos meios de cultura, os tamanhos de frascos e os tipos de tampas empregadas no fechamento dos recipientes, podem influenciar o desenvolvimento de algumas culturas (Souza *et al.* 1999).

A análise dos resultados de variância demonstrou que para todas as variáveis analisadas, comprimento total da plântula, comprimento da maior raiz, comprimento da maior folha, número de raízes, número de folhas, massa fresca da plântula inteira e massa seca da plântula inteira, houve melhor desenvolvimento de plântulas de *D. nobile* em frascos de 100 mL ($P < 0,05$) (Tab. 1). Entretanto, apesar da variância demonstrar significância para as variáveis, a análise de regressão linear para número de folhas ($R^2 = 0,62$), massa fresca da plântula ($R^2 = 0,61$) e massa seca da plântula ($R^2 = 0,44$), não demonstrou alta significância no desenvolvimento das plântulas em frascos de 100 mL (Figs. 1 e 2). Tais resultados são semelhantes aos encontrados por Calvete *et al.* (2002), para plântulas de morango obtidas *in vitro*, nas quais todas as medidas de

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile*, após 180 dias de cultivo em meio MS em frascos de diferentes volumes.

Frascos	Variáveis Avaliadas						
	AP (cm)	NR	NF	MF (g)	MS (g)	CMR (cm)	CMF (cm)
100 mL	2,24 a1	2,41 a	1,95 a	0,36 a	0,11 a	1,89 a	0,81 a
200 mL	1,68 b	1,82 b	1,60 b	0,22 b	0,06 b	1,33 b	0,71 b
400 mL	1,11 c	1,53 c	1,47 b	0,17 c	0,05 b	0,65 c	0,58 c
CV %	9,14	15,41	12,27	19,42	16,64	16,01	9,45

1. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. CV%, Coeficiente de variação.

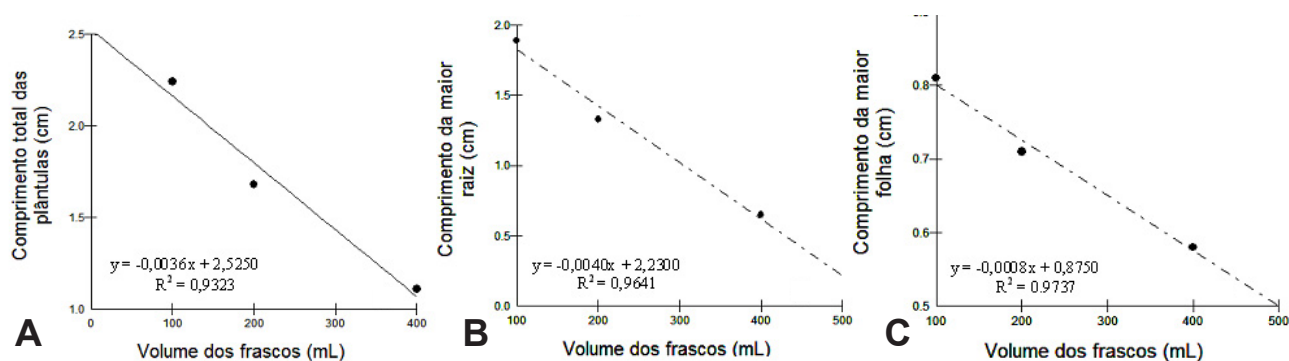


Figura 1. Regressão linear para as variáveis comprimento total da plântula (A), comprimento da maior raiz (B) e comprimento da maior folha (C), de plântulas de *Dendrobium nobile* cultivadas em frascos de 100 mL, 200 mL e 400 mL após 180 dias.

comprimento foram superiores em frascos de 125 mL quando comparados aos de 250 e 500 mL. Os autores salientam que o espaço limitado, a baixa irradiação, a alta umidade relativa do ar no interior dos frascos e as trocas gasosas ineficientes propiciam uma alta taxa de multiplicação, mas as plantas produzidas diferem anatômica e morfofisiologicamente daquelas plantas desenvolvidas em casa de vegetação e em campo, podendo apresentar graus diferentes de facilidade de aclimação. Os frascos

de menor volume, portanto, aproximam e expõem as plântulas a compostos voláteis, como por exemplo, etileno, gerando super-brotamentos e estiolamento dos brotos.

Segundo Pierik (1987), as tampas transparentes e os frascos de maiores dimensões permitem maior penetração de luz, o que promove maior respiração, em virtude de tornarem o ambiente *in vitro* mais seco. Estes fatores têm como consequência menor comprimento de plântulas, reduzido armazenamento de água em tecidos

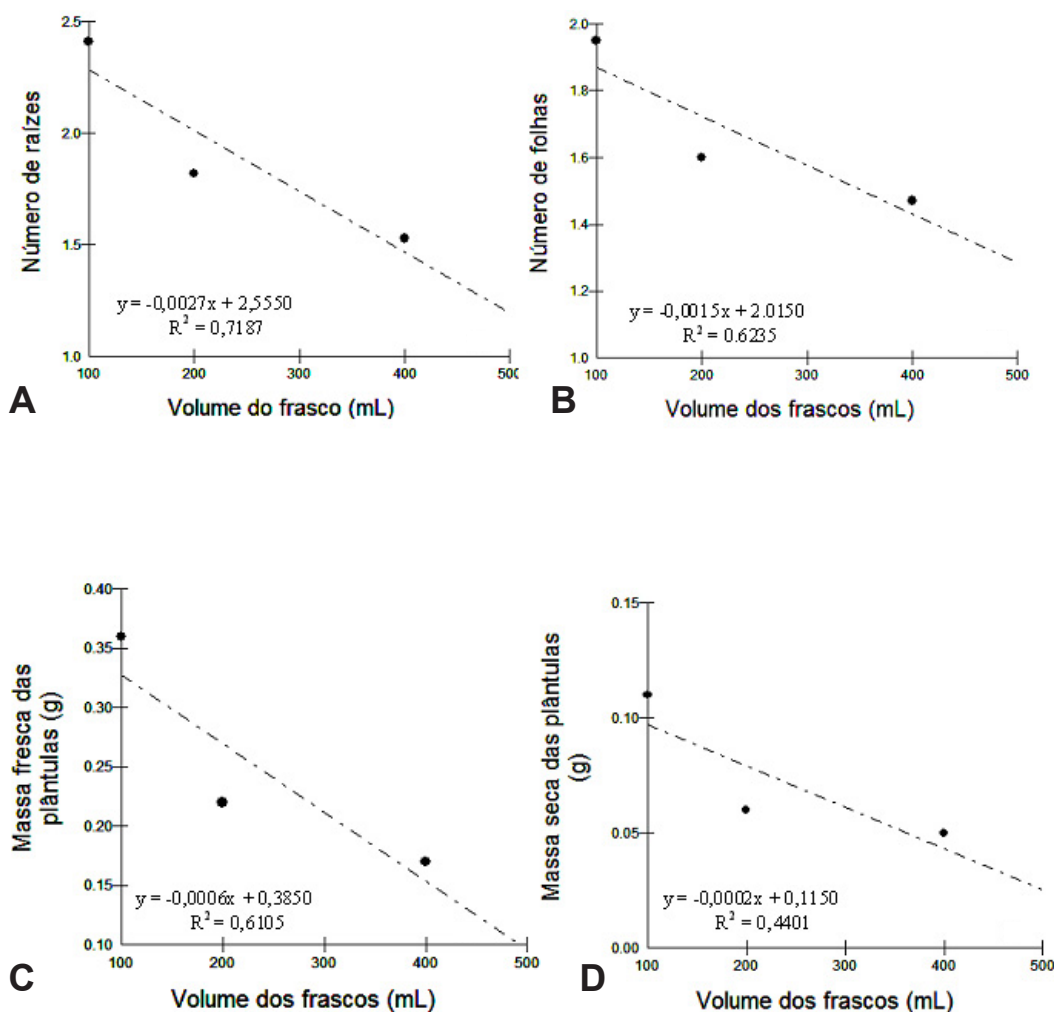


Figura 2. Regressão linear para as variáveis número de raízes (A), número de folhas (B), massa fresca (C) e massa seca (D), de plântulas de *Dendrobium nobile* cultivadas em frascos de 100 mL, 200 mL e 400 mL após 180 dias.

e diminuição no número de folhas e nabiomassa de plântulas desenvolvidas sob tais condições. Geralmente, a maioria das espécies de plantas cultivadas *in vitro* apresenta cutícula pouco desenvolvida, devido à alta umidade relativa (90 a 100%) nos frascos. Tal fato foi comprovado nos experimentos de Wardle *et al.* (1983) em que plântulas de couve-flor (*Brassica oleracea* var *botrytis*) apresentaram a formação de cutícula mais espessa depois de acentuada diminuição da umidade relativa durante o cultivo *in vitro*. Tais observações estão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho para os frascos de 200 mL e 400 mL, nos quais número de folhas e massa seca da plântula inteira menores foram observados quando comparados aos frascos de 100 mL para todas as variáveis analisadas (Figs. 1 e 2; Tab. 1).

Os resultados de massa fresca e massa seca (Fig. 2; Tab. 1) encontrados para *D. nobile*, corroboram com os encontrados por Monette (1986), em kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Linag & A. R. Ferguson], no qual se verificou maior proliferação e incremento na massa fresca e massa seca de partes aéreas com a utilização de frascos de 125 mL em comparação àqueles de 250 e 500 mL. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), frascos menores afetam a composição da fase gasosa e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento da cultura.

O número de raízes e comprimento da maior raiz obtidos neste trabalho confirmam aqueles obtidos com *Maytenus ilicifolia*, onde frascos com volumes de 125 mL permitiram maior desenvolvimento tanto em número quanto em comprimento do sistema radicular, embora não tenha afetado a síntese de compostos secundários (Buffa Filho *et al.* 2002). A hipótese dos autores se refere à oxigenação e incorporação de CO₂ mais rápida nos frascos menores quando comparados com os frascos de 250 mL, também utilizados no referido trabalho.

Vale ressaltar que um fator importante na escolha de um recipiente de cultivo é a praticidade de manuseio durante as fases da propagação. Desse modo, frascos de tamanho grande e médio apresentam-se pouco práticos, principalmente pela necessidade do uso de pinças longas para o manuseio das plântulas (Nicoloso & Erig 2002).

CONCLUSÃO

A utilização de recipientes de 100 mL resultou em maior desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. quando comparado aos recipientes de 200 e 400 mL de mesmo formato. No entanto, existe a necessidade de testes com recipientes de menores tamanhos e formatos diferenciados para completo entendimento das necessidades da espécie submetida ao cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ARDITTI, J. & ERNEST, R. 1992. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 682 p.

BUFFA FILHO, W.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. & FURLANI, M. 2002. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. *Eclética Química*, 27: 403-416.

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H. & SUZIN, M. 2002. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira*, 20: 649-653.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. 292 p.

MONETTE, P. L. 1986. Micropropagation of Kiwi fruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 73-82.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D. & FARIA, R. T. 2002. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, 24: 1397-1400.

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

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S. & RATH, S. P. 2001. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, 94: 107-116.

NICOLOSO, F. T. & ERIG, A. C. 2002. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 1: 1499-1506.

PARK, S. Y., MURTHY, H. N. & PAEK, K. Y. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*, 38: 168-172.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; DIOGO, J. A.; PEDRO, N. P.; CANABRAVA, R. I.; MARTINI, G. A. & MARTELINE, M. A. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências*, 7: 67-69.

PIERIK, R. L. M. 1987. *In vitro* culture of higher plants: closure of test tubes and flasks. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing. 344 p.

SANTOS, A. F.; VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; GOULART, M. S.; NOVAIS, R. F.; CECON, P. R.; TEIXEIRA, S. L. & MOURA, E. 2006. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. *Horta*, 46: 8-12.

SILVA, W. 1986. *Cultivo de Orquídeas no Brasil*. São Paulo: Ed. Nobel. 65p.

SOUZA, C. M.; PINTO J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R. & ARRIGONI-BLANK, M. F. 1999. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. *Ciência e Agrotecnologia*, 23: 830-835.

STANCATO, G. C. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7: 25-33.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F. & PASQUAL, M. 2007. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 16-20.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B. & SCHORT, K. C. 1983. *In-vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 386-389.