



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Dendrobium nobile* Lindl. EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

José Carlos Sorgato¹; Jackeline Schultz Soares²; Derek Brito Chaim Jardim Rosa¹; Luciano Souza de Rezende³; Suzana Targanski Sajovic Pereira³; Yara Brito Chaim Jardim Rosa⁴

1. Discentes do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD. (e-mail: jc_sorgato@hotmail.com).
2. Discente do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul/ UEMS.
3. Discentes do curso de Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD.
4. Docente da FCA da UFGD. Caixa Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a germinação das sementes de *Dendrobium nobile* em diferentes estágios de maturação. Aos 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após polinização (DAP), cinco pseudobulbos contendo frutos, foram destacados da planta-mãe e plantados em recipiente de polipropileno, permanecendo até 300 DAP. Depois desse período, os frutos foram destacados dos pseudobulbos, e avaliados quanto ao diâmetro da maior porção do ovário, comprimento e massa fresca do fruto, massa fresca das sementes e do pericarpo. Para cada época de coleta de frutos, as sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio e ao teste de germinação. Quanto maior o diâmetro do fruto, a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de germinação de *D. nobile* também aumentaram, e essa relação foi crescente à medida que aumentam os dias de permanência dos frutos na planta-mãe e, para que a porcentagem de germinação *in vitro* de *D. nobile* seja superior a 75% os pseudobulbos, contendo fruto, devem ser coletados a partir dos 166 DAP.

Palavras-chave: frutos de orquídeas, germinação *in vitro*, propagação

INTRODUÇÃO

A reprodução sexuada de orquídeas é utilizada quando se deseja produzir indivíduos geneticamente diferentes que podem ser mais adaptados às variações ambientais que ocorrem ao longo do tempo, viabilizando o processo de comercialização e reintrodução de espécies

(SUZUKI et al. 2009; SCHNEIDERS et al. 2012; SUZUKI et al. 2012).

Embora esse tipo de reprodução permita a variabilidade genética, os frutos demoram de meses a anos para estarem maduros (ARAUJO, 2012) e, quando se pensa em espécies nativas, o monitoramento dos mesmos no habitat, muitas vezes é inviável. Em função disso, plantas inteiras e providas de frutos são removidas do habitat e, na maioria dos casos, não sobrevivem a esse processo.

Como os frutos produzidos dependem das reservas nutricionais da planta para o seu desenvolvimento e, como a maioria deles é diretamente formada em um pseudobulbo, a remoção, apenas dessa estrutura, além de não comprometer a planta e a biodiversidade, poderia fornecer condições à maturação fisiológica das sementes formadas.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a germinação de sementes de *Dendrobium nobile* L. cujos pseudobulbos, providos de frutos, foram coletados em diferentes fases do desenvolvimento das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Área de Jardinocultura e no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados – MS, de novembro de 2012 a setembro de 2013.

Foram utilizadas matrizes de *Dendrobium nobile*, com dez anos de idade, acondicionadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50% ($162,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e provido de irrigação por microaspersão.

Quando da floração, cada planta teve uma flor autopolinizada manualmente. Aos 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias após polinização (DAP), cinco pseudobulbos que continham os frutos foram destacados, com auxílio de tesoura de poda manual, na inserção da base da planta-mãe. Cada pseudobulbo coletado, até 270 DAP, foi plantado em recipiente com volume de 500 mL, contendo como substrato areia esterilizada em autoclave ($120 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$), por 20 minutos, permanecendo nas mesmas condições das matrizes, até completarem 300 dias.

Aos 300 DAP os pseudobulbos foram removidos e transferidos para laboratório, a seguir, os frutos das plantas matrizes foram destacados dos pseudobulbos, e avaliados quanto ao diâmetro da maior porção do ovário, comprimento e massa fresca do fruto (MFF). Na sequência, os frutos foram lavados com água e detergente neutro, desinfestados com álcool (70%), abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas das cápsulas e homogeneizadas, respeitando-se cada tempo de coleta. Após este procedimento, as sementes

foram pesadas (MFS), sendo posteriormente calculada a massa fresca do pericarpo ($MFP = MFF - MFS$) e a porcentagem de MFP e MFS em relação à MFF.

Para cada época de coleta de frutos, 0,005 g de sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade conforme metodologia descrita por SOARES et al. (2012) sendo calculada a porcentagem de sementes viáveis conforme metodologia descrita por ROSA et al. (2013).

Após a confirmação da viabilidade, 0,005g de sementes de cada época de coleta, foram transferidas para Becker de 100 mL, sendo utilizado um Becker para cada tratamento. As suspensões de sementes foram desinfestadas, por 15 minutos, com uma solução composta por 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água destilada estéril (CAMPOS, 2002). Decorrido esse tempo, a solução de sementes foi diluída para 50 mL com água estéril para a realização da semeadura.

Utilizou-se o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e o pH $5,8 \pm 0,1$ (ajustado com KOH - 1M). Foram utilizados como frascos de cultivo, recipientes de polipropileno transparentes com capacidade para 50 mL, providos de tampa rosqueável que, após receberem 20 mL do meio nutritivo, foram esterilizados em autoclave a 120 °C e à pressão de 1,05 kg cm⁻² por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu 1000 µL da suspensão de sementes, sendo utilizados quatro frascos por tratamento. Na sequência, os frascos foram tampados e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12h e luminosidade de 20 µmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas brancas fluorescentes com 40 W cada.

Decorridos 45 dias da semeadura os frascos foram abertos, sendo contabilizados o número de sementes (NS) e o número de protocormos clorofilados (NPC). A porcentagem de germinação foi calculada pela seguinte expressão:

$$\%G = [NPC / (NS + NPC)] \times 100.$$

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições. Para análise estatística utilizou-se o aplicativo computacional SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG), as variáveis foram submetidas à análise de variância, e posteriormente às médias, foram ajustadas equações de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do tempo de coleta dos pseudobulbos após a polinização (DAP) ($p < 0,05$) sobre o diâmetro da maior porção do fruto (DMF), porcentagem de sementes viáveis (%SV) e germinação (%G) (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das análises de variância do diâmetro da maior porção (DMF) e do comprimento (CF) do fruto, da massa fresca do fruto (MFF), das sementes (MFS) e do pericarpo (MFP), porcentagens de massa fresca do pericarpo (%MFP) e das sementes (%MFS), porcentagem de sementes viáveis (%SV) e porcentagem de germinação (%G) de *Dendrobium nobile* Lindl. Dourados – MS, UFGD, 2013.

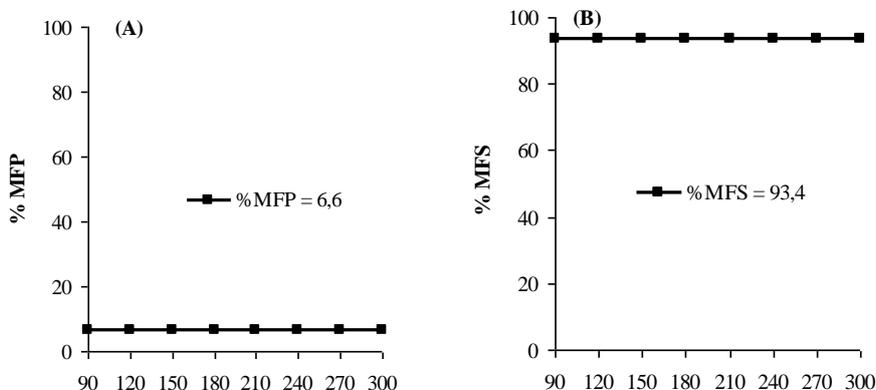
F.V.	G.L.	Quadrados médios								
		DMF	CF	MFF	MFS	MFP	%MFP	%MFS	%SV	%G
DAP	7	0,11*	0,09 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,44**	3,74**
Erro	32	0,04	0,06	0,09	0,09	0,01	0,24	0,03	0,04	0,52
CV(%)		4,7	3,1	9,8	10,1	8,0	18,3	1,9	2,21	15,9
Média		19,3mm	60,7mm	8,6g	8,0g	0,6g	6,6%	93,4%	84,1%	20,7%

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

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

^{ns} não significativo

Embora a proporção entre massa fresca de sementes e do pericarpo, assim como o comprimento dos frutos de *Dendrobium nobile*, não tenham sido influenciados pelo tempo de coleta dos pseudobulbos (Figura 1A, B, D), à medida que os pseudobulbos foram colhidos mais tarde, houve aumento no diâmetro dos frutos, assim como na porcentagem de sementes viáveis e de germinação (Figura 1C, E, F). Isso provavelmente ocorreu em função dos frutos coletados precocemente só terem disponíveis os fotoassimilados contidos no pseudobulbo, enquanto que aqueles coletados aos 300 dias após a polinização DAP, além de não passarem pelo estresse físico, ainda dispuseram de fotoassimilados da planta toda.



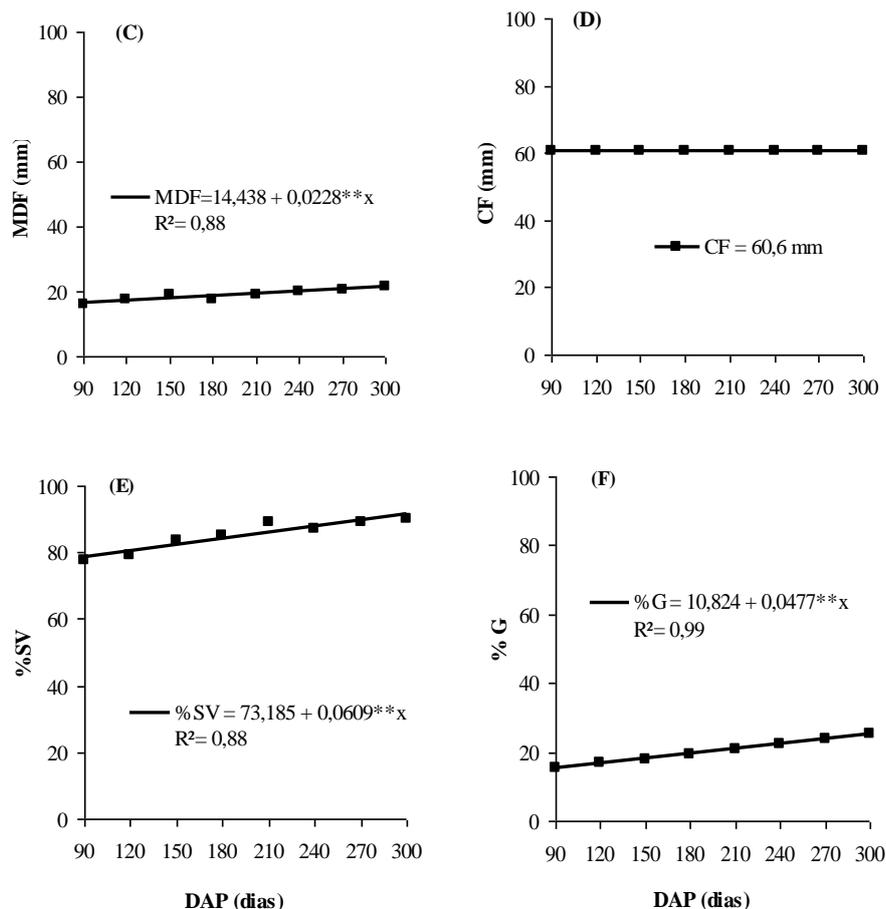


Figura 1. Frutos de *Dendrobium nobile* Lindl. (A) Porcentagem de massa fresca do pericarpo (%MFP); (B) Porcentagem de massa fresca das sementes (%MFS); (C) Maior diâmetro do fruto (MDF); (D) Comprimento do fruto (CF); (E) Porcentagem de sementes viáveis (%SV); (F) Porcentagem de germinação (%G) observados em função do tempo de coleta dos pseudobulbos após a polinização (DAP= dias após a polinização). Dourados-MS, UFGD, 2013.

Frutos colhidos aos 90 DAP apresentaram diâmetro de 16,5 mm, enquanto que aqueles colhidos aos 300 DAP apresentaram diâmetro de 21,3 mm. Vale salientar que, mesmo os pseudobulbos colhidos aos 90 DAP apresentaram frutos com cerca de 79 % de sementes viáveis que, ao serem germinadas *in vitro*, apresentaram 15 % de germinação aos 30 dias de cultivo, correspondendo a 66 plantas por frasco de cultivo.

ROSA et al. (2013), estudando a viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata*, observaram baixa correlação do teste de tetrazólio com o de germinação, inferindo que o método amostral desse teste pode ser utilizado apenas para prever a viabilidade das sementes e não a provável porcentagem de germinação, uma vez que o teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração, tornando possível distinguir as partes vivas daquelas mortas que não colorem (OLIVEIRA et al. 2005).

Pseudobulbos coletados aos 300 DAP apresentaram 91 % de sementes viáveis, com

porcentagem de germinação de 25 %, correspondendo a 110 plântulas por frasco. Embora o número de sementes viáveis seja apenas 12% maior em pseudobulbos coletados aos 300 DAP, a porcentagem de germinação dessas sementes foi o dobro daquelas coletadas aos 90 DAP evidenciando novamente a baixa correlação entre o teste tetrazólio amostral e a germinação *in vitro*.

Os resultados observados permitem inferir a existência de uma relação entre o diâmetro do fruto, a porcentagem de sementes viáveis e a porcentagem de germinação de *D. nobile*, que é crescente à medida que aumentam os dias de permanência dos frutos na planta-mãe.

Porcentagem de germinação igual ou superior a 50% daquela observada em frutos fisiologicamente maduros foi considerada satisfatória por SOUSA (2013), para *Brassavola tuberculata* Hook. Entretanto, para *D. nobile*, a porcentagem de germinação ideal é em torno de 75% daquela observada em frutos fisiologicamente maduros. Em vista disso, a coleta de pseudobulbos de *D. nobile* contendo um fruto, a partir de 166 dias da polinização, é viável para a sua reprodução sexuada *in vitro*. De maneira análoga, pode-se inferir que outras espécies que apresentem pseudobulbos com boas reservas nutricionais também viabilizem esse procedimento.

CONCLUSÃO

Para que a porcentagem de germinação *in vitro* de *D. nobile* seja superior a 75% os pseudobulbos providos de um fruto devem ser colhidos a partir dos 166 dias após a polinização.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos concedidas e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela assistência.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, A. G. Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, Aracaju, SE, 2012. **Anais...** / III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, Aracaju, SE, Brasil, 11 e 12 de setembro de 2012 – Brasília, DF : Embrapa, 2012. 156p.
- CAMPOS, D. M. **Orquídea: manual prático de reprodução**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- MENGARDA, L. H. G.; LOPES, J. C.; SOUZA, F. B. C.; FREITAS, A. R. Efeito do AIB e do ácido bórico na formação e enraizamento de brotos laterais em estacas de orquídeas. **Revista Nucleus**, Itaperava, v. 10, n. 2, p. 139-149, 2013.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert leguminosae caesalpinioideae. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.

ROSA, Y. B. C. J.; MARQUES JÚNIOR, G. A.; SOARES, J. S.; ROSA, D. B. C. J.; MACEDO, M. C.; CEZAR, A. M. A. Estudo da viabilidade de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do período de armazenamento, tempo de cultivo e tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 19, n. 2, p. 155-160, 2013. 1 CD.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, D.; ROSETE, B.; RAITZ, M.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C., SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 226-33, 2012.

SOUSA, G. G. **Germinação e crescimento *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae)**. 2013. 91f. Tese de Doutorado – Universidade Federal da Grande Dourados.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. M. 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.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. **Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina***. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 48, p. 500-511, 2012.