



UTILIZAÇÃO DE AGENTES GELEIFICANTES ALTERNATIVOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Dendrobium nobile* Lindl.

Jackeline Schultz Soares¹, Yara Brito Chaim Jardim Rosa², José Carlos Sorgato³,
Derek Brito Chaim Jardim Rosa³, Suzana Targanski Sajovic Pereira⁴

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

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O cultivo *in vitro* tem sido o principal método de propagação de orquídeas, entretanto os meios de cultura são complexos e seus constituintes de difícil aquisição. Objetivou-se com este trabalho avaliar a substituição parcial ou total do ágar (AA) por amido de milho (AM) ou fécula de araruta (FA), em meio de cultura alternativo, no crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile*. Após seis meses de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas, número, diâmetro e comprimento dos pseudobulbos, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa fresca. Os tratamentos influenciaram ($p < 0,01$) todas as variáveis analisadas e, de maneira geral, a utilização de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de AA, acrescido de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de AM propiciou maior crescimento das plantas. Conclui-se que a substituição de 50 % do ágar pelo amido de milho, no meio alternativo, é benéfica ao crescimento *in vitro* de *D. nobile* e, que a substituição total do ágar por amido de milho ou pela fécula de araruta, prejudica o crescimento dessa espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Floricultura, Orchidaceae, Amido de milho, Fécula de araruta.

USE OF ALTERNATIVE GELLING AGENTS ON *IN VITRO* CULTIVATION OF *Dendrobium nobile* Lindl.

ABSTRACT

In vitro cultivation has been the main method of orchid propagation, however the culture media are complicated and their constituents are difficult to purchase. This study aimed to evaluate the partial or full replacement of agar (AA) by corn starch (AM) or arrowroot starch (FA), in the alternative culture media, on *in vitro* growth of *Dendrobium nobile*. After six months of cultivation, the plants were evaluated on the number of leaves, number, diameter and length of the pseudobulbs, number of roots,

longest root length and fresh weight. The treatments affected ($p < 0.01$) all variables and, in general, the use of 7.0 g L^{-1} AA plus 7.0 g L^{-1} AM provided higher plant growth. We concluded that replacing 50% of agar for corn starch on the alternative media is beneficial to the growth *in vitro* of *D. nobile* and the total replacement of agar by corn starch or arrowroot starch impairs the growth of this species.

KEYWORDS: Floriculture, Orchidaceae, Corn starch, Arrowroot starch

INTRODUÇÃO

A espécie *Dendrobium nobile* Lindl, conhecida como olho de boneca, é uma das orquídeas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso. O interesse por essa espécie é devido à sua ampla distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e, principalmente, ao seu valor florístico (VICHATO et al., 2007).

O cultivo de Orchidaceae representa uma atividade de grande importância econômica (JUNQUEIRA & PEETZ, 2014). O método mais utilizado para a sua multiplicação é a propagação *in vitro*, que, embora seja importante por possibilitar a obtenção de um grande número de mudas em pequeno espaço físico, pouco tempo e com grande qualidade sanitária (STANCATO et al., 2001; ALTAFIN et al., 2003), encontra-se restrito a poucos produtores devido a dificuldade de aquisição dos constituintes dos meios de cultivo. Esses meios apresentam composição complexa, com diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento (VENTURA et al., 2002), que elevam os custos da propagação. Por esta razão e visando a facilidade de formulação e acessibilidade dos componentes, CAMPOS (2002) propôs um meio alternativo, no qual a maioria das orquídeas germina e cresce.

Além da composição dos meios, outro fator a ser considerado é a sua consistência, que é geralmente semi-sólida (MACEDO et al., 2003). O ágar é o agente geleificante mais utilizado na solidificação dos meios de cultura. GEORGE (1993) atribui isto à vantagem deste solidificante formar um colóide quando adicionado à água, tornando-se líquido a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e solidificando-se a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, mantendo-se estável nas temperaturas de incubação.

Embora com inquestionável propriedade geleificante, ao ágar geralmente estão associados inibidores orgânicos e inorgânicos (PIERIK, 1987), que podem alterar as características químicas e físicas do meio de cultura e, conseqüentemente, as respostas *in vitro* (ROMBERGER & TABOR, 1971). Em vista disso, estudos utilizando amido de milho ou de mandioca em substituição ao ágar, apresentaram bons resultados para algumas culturas, principalmente na fase de enraizamento (FORTES et al., 1994). Entre as vantagens destes polissacarídeos, pode-se citar a facilidade de obtenção e o baixo custo quando comparados ao ágar, fatos que poderiam torná-los importantes aliados na busca da maior eficiência econômica do processo de propagação de plantas em laboratório (PEREIRA & FORTES, 2003).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a substituição parcial ou total do ágar por amido de milho ou fécula de araruta, em meio de cultura alternativo, no crescimento *in vitro* de *D. nobile*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA). Foram utilizadas como material de estudo plantas de *D. nobile* oriundas de autopolinização manual e cultivadas *in vitro* por seis meses, sem sub-cultivos, em meio alternativo (CAMPOS, 2002), acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Foram selecionadas plantas, em ambiente asséptico, que apresentavam duas folhas, um pseudobulbo com 0,5 cm de comprimento e uma raiz e a seguir as plantas foram transferidas para os meios de cultura a serem estudados.

Utilizou-se um meio de cultura proposto por CAMPOS (2002), modificado pela utilização de 70 g de tomate tipo italiano, variedade *Santa Cruz*, maduros, vermelhos, sem casca e sementes, 50 g de banana nanica amarelada, sem casca (provenientes de cultivo convencional), 3 mL de adubo NPK na formulação 10-10-10, 25 g de sacarose comercial – $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 3 g de carvão ativado, 150 mL de água de coco e água destilada para completar um litro.

Como agentes geleificantes do meio de cultivo foram utilizados o ágar-ágar (AA), a fécula de araruta (FA) ou o amido de milho (AM) constituindo os seguintes tratamentos: T1 - AA 14 g.L^{-1} ; T2 - AM $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $10,5 \text{ g.L}^{-1}$; T3 - AM $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $7,0 \text{ g.L}^{-1}$; T4 - AM $10,5 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $3,5 \text{ g.L}^{-1}$; T5 - AM 14 g.L^{-1} ; T6 - FA $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $10,5 \text{ g.L}^{-1}$; T7 - FA $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $7,0 \text{ g.L}^{-1}$; T8 - FA $10,5 \text{ g.L}^{-1}$ + AA $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ e T9 - FA 14 g.L^{-1} .

Após homogeneização no liquidificador, o pH foi ajustado para 5,0 com KOH (1M) e o meio de cultura foi transferido para frascos de 600 mL providos de tampa metálica. Cada frasco recebeu 80 mL de um dos meios de cultura sendo, a seguir, esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1 atm de pressão. Em seguida à esterilização e solidificação do meio, os frascos foram transferidos para câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com luz germicida por 15 minutos, e cada frasco recebeu cinco plantas.

Após o plantio os frascos foram tampados e lacrados com filme plástico, sendo acondicionados em sala de crescimento com temperatura média de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, e luminosidade de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Decorridos seis meses do plantio, os frascos foram abertos, as plantas foram lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultura e avaliadas quanto ao número de folhas, número, diâmetro e comprimento dos pseudobulbos, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa fresca.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com nove tratamentos e 10 repetições, de um frasco de cultivo cada. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas por teste de médias (Scott-Knott a 5% de probabilidade) com a utilização do aplicativo computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo ($p < 0,01$), dos tratamentos sobre todas as variáveis analisadas (Tabela 1) e, de maneira geral, a utilização de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de AA, acrescido de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de AM, propiciou maior crescimento das plantas enquanto que a substituição total do ágar-ágar pelo amido de milho ou pela fécula de araruta não foi favorável ao desenvolvimento in vitro de *D. nobile* (Tabela 2).

O bom resultado da substituição parcial ou total do ágar pelo amido de milho pode estar relacionado à baixa consistência do meio de cultura obtida com a utilização desse geleificante. Segundo PIERIK (1987), meios de cultura mais consistentes dificultam o contato entre a plântula e o meio, limitando a absorção de compostos, fato este confirmado por PAIVA et al. (1999) em microestaquia de crisântemo. Por outro lado meios com menor consistência proporcionam maior área de contato com o sistema radicular, favorecendo a absorção de água e de nutrientes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), de pseudobulbos (NB) e de raízes (NR), diâmetro (DB) e comprimento (CB) de pseudobulbos, comprimento da maior raiz (CR), e massa fresca (MF) das plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. UFGD, Dourados - MS, 2012.

FV	GL	Quadrados médios						
		NF	NB	NR	DB	CR	CB	MF
Geleificantes	8	1,63**	0,28**	3,00**	0,33**	2,05**	0,44**	0,77**
Resíduo	81	0,16	0,03	0,12	0,01	0,03	0,01	0,02
CV(%)		17,4	11,1	18,8	3,4	12,1	7,3	4,1
Média geral		4,8	1,5	3,0	0,4cm	1,6cm	1,6cm	0,2g

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

TABELA 2. Número de folhas (NF), de pseudobulbos (NB) e de raízes (NR), diâmetro (DB) e comprimento (CB) de pseudobulbos, comprimento da maior raiz (CR), e massa fresca (MF) das plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. UFGD, Dourados - MS, 2012.

Geleificantes (g L^{-1})	NF	NB	NR	DB (cm)	CR (cm)	CB (cm)	MF (g)
14,0 AA	5,00 b	1,90 b	4,30 b	0,51 a	3,35 a	1,70 c	0,31 c
10,5 AA + 3,5 AM	5,40 b	1,50 c	4,30 b	0,48 a	2,99 a	2,14 b	0,35 c
7,0 AA + 7,0 AM	9,60 a	2,60 a	6,70 a	0,45 a	2,44 b	2,58 a	0,55 a
3,5 AA + 10,5AM	5,30 b	2,10 b	3,40 b	0,38 b	1,37 c	1,92 c	0,17 d
14,0 AM	3,10 c	1,10 c	1,00 c	0,29 c	0,16 d	1,23 d	0,07 e
10,5 AA + 3,5 FA	5,90 b	1,40 c	4,60 b	0,51 a	3,27 a	2,27 b	0,43 b
7,0 AA + 7,0 FA	3,60 c	1,00 c	1,00 c	0,21 d	0,15 d	0,90 e	0,03 e
3,5 AA + 10,5FA	3,30c	1,20 c	1,70 c	0,26 c	0,59 d	0,96 e	0,04 e
14,0 FA	2,50 c	1,00 c	0,20 c	0,16 d	0,01 d	0,69 e	0,01 e

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Scott-knott, 5%)

AA=ágar-ágar; AM= amido de milho; FA= fécula de araruta

Resultados semelhantes foram relatados por COSTA et al. (2007), que, estudando a brotação e estabelecimento de gemas de abacaxizeiro *in vitro*, relataram que a porcentagem de desenvolvimento das gemas da cultivar Rio Branco foi significativamente superior quando estas foram cultivadas em meios suplementados com amido, combinado ou não com ágar. Esses meios apresentaram, em média, 90% de gemas desenvolvidas, valores estes significativamente superiores aos obtidos no meio solidificado somente com ágar, onde a média de gemas desenvolvidas foi de 34,7%. Também ERIG et al. (2004), estudando agentes geleificantes na multiplicação *in vitro* de macieira, observaram os maiores para o número gemas com a utilização de ágar ou sua substituição parcial pelo amido de milho.

Embora COSTA et al. (2007) não tenham observado diferenças estatísticas na altura de brotações e no número de folhas de abacaxizeiro cultivado *in vitro* com diferentes agentes geleificantes, neste estudo a utilização de 7,0 g L⁻¹ de AA acrescido de 7,0 g L⁻¹ de AM propiciou acréscimos significativos não só na brotação de *D. nobile*, mas também nas demais características vegetais avaliadas. Ressalta-se que o comprimento da maior raiz foi menor neste tratamento (demonstrando que não houve necessidade de investimento no alongamento radicular como forma de aumentar a área de exploração do substrato), entretanto o número de raízes foi maior. Isso é vantajoso, pois quanto maior o número de raízes, maior a capacidade de sobrevivência no ambiente *ex vitro*, uma vez que as raízes são responsáveis não apenas pela absorção de água e nutrientes, mas também pela fixação dessas epífitas no forófito.

CONCLUSÃO

Em vista do exposto conclui-se que a substituição em 50 % do ágar pelo amido de milho no meio alternativo é benéfica ao crescimento *in vitro* de *D. nobile* e que a substituição total do ágar por amido de milho ou pela fécula de araruta prejudica o crescimento dessa espécie.

REFERÊNCIAS

ALTAFIN, R. L. M.; MENEZES, M. O.; LIMA, R. R. F.; PITOMBO, L. M. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. **Boletim Técnico**, Espírito Santo do Pinhal, n.7, 2003.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. 3. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 2002, 143p.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, p.41-46, 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v.10, n.3, p.297-302, 2004.

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de Experimentos - SISVAR. **Universidade Federal de Lavras**, 2010.

FORTES, G. R. de L.; CONCEIÇÃO, A. M.; ZANOL, G. **Uso do amido comercial como meio solidificante para enraizamento *in vitro* de morangueiro (Fragaria x ananassa)**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13, 1994, Salvador. Anais... Salvador: Associação Brasileira de Fruticultura, p.1113-1114, 1994.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 The technology. 2. ed. Edington: Exegetis, 1993, 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260, 1998.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira: balanço 2013 e perspectivas para 2014**. Disponível em: < http://www.hortica.com.br/artigos/2014/2013_Comercio_Exterior_Floricultura.pdf>. Acesso em: 24 set. 2014.

MACEDO, C. E. C.; SILVA, M. G.; NOBREGA, F. S.; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.25, n.3, p.501-504, 2003.

PAIVA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. **Ceres**, v.46, p.141-148, 1999.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff. 1987, 344p.

ROMBERGER, A.; TABOR, C. A. The Picea abies shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, v.58, p.131-140, 1971.

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**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; TEIXEIRA, L. S.; CARVALHOS, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R. P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres** v.47, p.613-628, 2002.

VICHIATO, M. R. de M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M. de; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com

pulverização de ácido giberélico. **Ciência e agrotecnologia**, v.31, n.1, p.16-20, 2007.