

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO
DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE
REGULADORES HORMONAIS E ÁGUA DE COCO**

JACKELINE SCHULTZ SOARES

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL

2010

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE
Dendrobium nobile Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES
HORMONAIS E ÁGUA DE COCO

JACKELINE SCHULTZ SOARES

Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: PROF.^a DR.^a. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2010

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

635.93415 Soares, Jackeline Schultz
S676g Germinação assimbiótica e desenvolvimento de
Dendrobium nobile Lindl. sob efeito de reguladores
hormonais e água de coco. / Jackeline Schultz Soares. –
Dourados, MS: UFGD, 2010.
37f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yara Brito Chaim Jardim Rosa
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade
Federal da Grande Dourados.

1. Orchidaceae. 2. *Dendrobium nobile*. 3. Orquídeas -
Cultivo in vitro. I. Título.

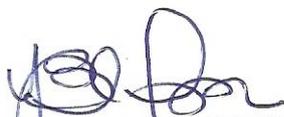
GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS E ÁGUA DE COCO

por

Jackeline Schultz Soares

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

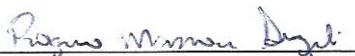
Aprovada em: 18 / 02 / 2010



Prof.^a Dr.^a Yara B. Chaim J. Rosa
Orientadora – UFGD/FCA



Prof. Dr. Edgard Jardim Rosa Junior
Co-Orientador – UFGD/FCA



Prof. Dr. Rogério Mamoru Suzuki
Co-Orientador – IBOT/SP

A DEUS

Aos meus pais,
Adelsom e Carmen

A minha irmã,

Janaína

Dedico

AGRADECIMENTOS

A cada vitória, o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa;

Aos meus pais, Adelson Soares Filho e Carmen Dulsi Schultz pelo amor, apoio e dedicação incondicionais, e a minha irmã Janaína Schultz Soares, pela amizade e companheirismo;

A Prof^a. Dr^a. Yara Brito Chaim Jardim Rosa, pela orientação, amizade, dedicação e oportunidade. Por me mostrar como ser uma profissional correta e competente, sendo meu exemplo, fonte de inspiração, apoio e ensino diário;

Aos professores Dr^a. Silvana de Paula Quintão Scalon, Dr. Edgard Jardim Rosa Junior e Dr. Rogério Mamoru Suzuki, co-orientadores desta dissertação, por sua ajuda, interesse, e sábias idéias;

A Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade concedida e incentivo a formação de novos profissionais;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante o período da realização desse trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela oportunidade de aprendizado;

Aos amigos queridos, de perto e de longe, mas que tanto me ajudaram, a minha gratidão;

As colegas de Mestrado Mirianny Elena de Freitas, Marichel Canazza de Macedo e Mariana Bento Tatara, pela diversão, aprendizado, convivência, amizade e companhia, essenciais durante esse período;

A todos que já falei, agradeço por acreditarem no meu potencial, na minha profissão e nas minhas idéias, principalmente quando nem eu mais acreditava. Sem vocês nada disso seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.
CAPÍTULO I – GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS NO TRATAMENTO PRÉ-GERMINATIVO.....	4
RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1. Tratamento pré-germinativo.....	7
2.2. Semeio <i>in vitro</i>	7
2.3. Avaliação das variáveis e atributos vegetais.....	8
2.4. Delineamento Estatístico.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
3.1. Germinação e número de plântulas.....	Erro! Indicador não definido.
3.2. Atributos Vegetais	Erro! Indicador não definido.
4. CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.
CAPÍTULO II - EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE ÁGUA DE COCO NO MEIO DE CULTURA, NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	23

1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. Semeio <i>in vitro</i>	26
2.2. Avaliação das variáveis e atributos vegetais.....	27
2.3. Delineamento Estatístico.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. CONCLUSÕES	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CONCLUSÕES GERAIS.....	37

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS NO TRATAMENTO PRÉ-GERMINATIVO.

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de plântulas (NP) e porcentagem de germinação (G), em função das concentrações dos reguladores vegetais utilizados. Dourados, 2009 10

TABELA 2. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), em função dos tratamentos com o regulador vegetal BAP. Dourados, 2009... 14

TABELA 3. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), em função dos tratamentos com o regulador vegetal GA3. Dourados, 2009..... 16

CAPÍTULO II - EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE ÁGUA DE COCO NO MEIO DE CULTURA, NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE *Dendrobium nobile* Lindl.

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de plântulas (NP) e porcentagem de germinação (G), observados no final do período experimental. Dourados, 2009. 28

TABELA 2. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), observados no final do período experimental. Dourados, 2009..... 29

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS NO TRATAMENTO PRÉ-GERMINATIVO.

- FIGURA 1. Sementes intumescidas e protocormos de *D. nobile* Lindl. em meio de cultura alternativo (aumento de 16x) Dourados, 2009. 11
- FIGURA 2. Número de plantas e porcentagem de germinação de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de reguladores hormonais utilizadas. 12
- FIGURA 3. Número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e número de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas. 14
- FIGURA 4. Comprimento da maior raiz (CR) e altura da planta (AP) de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas. 15
- FIGURA 5. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas..... 16
- FIGURA 6. Número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e número de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas..... 17
- FIGURA 7. Comprimento da maior raiz (CR) e altura da planta (AP) de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas..... 18
- FIGURA 8. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas..... 18

CAPÍTULO II - EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE ÁGUA DE COCO NO MEIO DE CULTURA, NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE *Dendrobium nobile* Lindl.

- FIGURA 1. Valores médios do número de plântulas (A) e taxa de germinação (%) (B) de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados..... 28
- FIGURA 2. Valores estimados de número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e valores observados de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados..... 30

FIGURA 3. Altura da planta (AP), comprimento de raízes (CR) e número de pseudobulbos (NP) de plantas de <i>D. nobile</i> , em função dos volumes de água de coco utilizados.....	31
FIGURA 4. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de <i>D. nobile</i> , em função dos volumes de água de coco utilizados.....	32

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS E ÁGUA DE COCO

Jackeline Schultz Soares, Yara Brito Chaim Jardim Rosa, Silvana de Paula Quintão Escalon, Edgard Jardim Rosa Junior, Rogério Mamoru Suzuki.

RESUMO

Orchidaceae diferencia-se da maioria das famílias botânicas por suas sementes não possuírem reservas suficientes para a germinação. O presente trabalho objetivou: 1- estudar a influência dos reguladores hormonais BAP (6-benzilaminopurina) e GA₃ (ácido giberélico), nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹, como tratamento pré-germinativo no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl; 2- determinar o volume de água de coco (0; 50; 100; 150 e 200 mL L⁻¹), que, acrescido ao meio de cultura proporcionou melhor germinação e cultivo *in vitro* de *D. nobile*. Foram utilizadas como material de estudo sementes de *D. nobile* produzidas mediante autopolinização manual. Após seis meses do semeio e permanência em câmara de germinação e crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (12 horas e 23 °C ± 2) as plântulas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto ao número, porcentagem de germinação, massa fresca, altura, diâmetro e número de pseudobulbos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos à análise de variância e quando significativos à regressão. As sementes de *D. nobile* germinaram mais na ausência de reguladores vegetais, e os tratamentos com BAP ou GA₃ na embebição das sementes influenciaram estatisticamente o desenvolvimento *in vitro* de *D. nobile*. A adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura propiciou os melhores resultados para altura de plantas, número de raízes, número de pseudobulbos e massa fresca de *D. nobile*.

Palavras chaves: Orchidaceae, cultivo *in vitro*, BAP, GA₃.

ASYMBIOTIC GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Dendrobium nobile* Lindl. UNDER EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS AND COCONUT WATER

ABSTRACT

Orchidaceae differs of most botanical families by its seeds did not have enough reservations for germination. The present work aimed: 1. to study the influence of plant growth regulators BAP (6-benzylaminopurine) e GA₃ (gibberellic acid), at concentrations of 0.0; 2.0 and 5.0 mg L⁻¹, as pre-germinative treatment in the process of initial development of *Dendrobium nobile* Lindl seedlings; 2. to determine the volume of coconut water (0; 50; 100; 150 and 200 mL L⁻¹), that, added to culture media, promoted better germination and *in vitro* cultivation of *D. nobile*. Seeds of *D. nobile* that were produced by manual self-pollinating were used as material of study. After six months of sowing and keeping in germination and growth chamber with controlled temperature and photoperiod (12 hours and 23 °C ±), seedlings were removed from pots and evaluated about number, percentage of germination, fresh mass, height, diameter and number of pseudobulbs, number of leaves, number of roots and length of the greatest root. Completely randomized experimental design was used. Every variables and vegetal attributes were submitted to variance analysis and when they were significative, to regression analysis. *D. nobile* seeds germinated more in the absence of plant growth regulators and treatments with BAP or GA₃ for imbibitions of seeds influenced statistically *in vitro* development of *D. nobile*. The addition of 200 mL L⁻¹ of coconut water to culture media promoted the best results for plant heights, number or roots, number of pseudobulbs and fresh mass of *D. nobile*.

Keywords: Orchidaceae, *in vitro* cultivation, BAP, GA₃.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas da família Orchidaceae são cultivadas em grande parte do mundo, pela beleza e durabilidade das flores, diversidade de cores, fácil hibridação e reprodução, possibilitando a produção, comercialização e o transporte a longas distâncias. A produção comercial de orquídeas no Brasil é altamente vantajosa, uma vez que o País detém boa parte dos recursos genéticos utilizados para aumentar a produtividade, melhorar a qualidade, além de outras características ornamentais desejáveis favorecidas pelas condições climáticas de algumas de suas regiões, reduzindo custos de produção e aumentando a produtividade (CARDOSO, 2007).

As exportações brasileiras de mudas de orquídeas em 2007 foram de US\$ 233,91 mil, apresentando um crescimento de 43,62% em relação a 2006. Deve-se ressaltar que o estado de Mato Grosso do Sul foi o maior fornecedor interno de mudas, contribuindo com 40,35% das exportações brasileiras em 2007 (JUNQUEIRA & PEETZ, 2007).

O gênero *Dendrobium* apresenta mais de 1500 espécies, sendo considerado um dos maiores da família e apresentando grande variabilidade genética. É considerado o mais produzido e comercializado, tanto no Brasil quanto no exterior, devido à sua larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e valor florístico (LORENZI & SOUZA, 1999; JONES et al., 1998).

Dentre as espécies deste gênero, ressalta-se *Dendrobium nobile* Lindl. originária da China e do Himalaia, sendo uma das orquídeas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso.

Estudos realizados pelo Grupo de Pesquisa de Plantas Ornamentais da UFGD constataram que essa planta não apresenta barreiras pós-zigóticas relacionadas à autopolinização artificial manual e as sementes produzidas germinam em meio assimbiótico alternativo proposto por Campos (2002), em pH 5,0; porém não se desenvolvem satisfatoriamente *in vitro* apresentando problemas também para a aclimação *ex vitro*.

Isso ocorre porque os meios nutritivos para a germinação e desenvolvimento das plântulas são específicos para cada espécie ou híbrido estudado (FORTES & PEREIRA, 2001). Nesse sentido, alguns procedimentos podem favorecer a eficiência do processo produtivo de micropropagação de plantas.

Em geral, nas culturas *in vitro* utilizam-se reguladores de crescimento vegetal com funções auxínicas, que promovem o enraizamento, mas, em embebição de sementes de Orchidaceae, esses reguladores não surtiram efeito, como verificado por Barroso et al. (1990) e Miyoshi & Mii (1995).

Hadley & Harvais (1968) também descreveram que combinações de quinetina (citocinina) e ácido indolacético (auxina) permitem um bom desenvolvimento de orquídeas e que fatores externos, como luz e temperatura, podem antecipar o estágio de desenvolvimento e que o uso de reguladores hormonais como tratamento pré-germinativo pode auxiliar no processo de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Além do exposto o meio de cultura deve suprir os macro e micronutrientes necessários ao crescimento das plântulas. Assim sendo, vários elementos aditivos complexos como água de coco, peptona e polpa de banana foram utilizados nos meios de cultura para micropropagação ou germinação de sementes de orquídeas visando melhoria nos resultados do cultivo *in vitro*. Entretanto, os dados comparativos disponíveis não permitem uma conclusão definitiva sobre o efetivo estímulo ao crescimento promovido por esses elementos (George, 1993) o que justifica a realização desse trabalho que teve os seguintes objetivos:

- 1- estudar a influência dos reguladores hormonais BAP (6-benzilaminopurina) e GA₃ (ácido giberélico) como tratamento pré-germinativo no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *D. nobile*.
- 2- determinar a concentração de água de coco, que, acrescida ao meio de cultura, propiciou melhor germinação e cultivo *in vitro* de plântulas de *D. nobile*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROSO, J.; FEVEREIRO, P.; OLIVEIRA, M. M.; PAIS, M. S. S. In vitro seed germination, differentiation and production of miniturbers from *Ophrys lutea* Ca., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. **Scientia Horticulturae**, v. 42, p. 329-37, 1990.
- CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- CARDOSO, J. C. **Ácido giberélico (GA₃) na indução do florescimento de orquídeas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007. 50p.
- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture, part 1 – The technology**. 2. Ed., Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- HADLEY, G.; HARVAIS, G. The effect of certam growth substances on asybiotic germination and development or Orchids pupurella. **New Phyholisty**. v. 67, p. 44, 1968.
- JONES, W. E.; KUEHNLE, A. R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, New York, v. 82, n. 2, p. 189-194, 1998.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil – janeiro a dezembro de 2007**. Disponível em: < <http://www.ibraflor.com.br> > Acesso em: 12 dez. 2009.
- LORENZI, L.; SOUZA, H. M. de **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1999. 1088p.
- MIYOSHI, K.; MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 63, n. 3-4, p. 263-267, 1995.

CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E DESENVOLVIMENTO DE *Dendrobium nobile* Lindl. SOB EFEITO DE REGULADORES HORMONAIS NO TRATAMENTO PRÉ-GERMINATIVO.

RESUMO. Orchidaceae diferencia-se da maioria das famílias botânicas por suas sementes não possuírem reservas suficientes para a germinação. O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência dos reguladores hormonais BAP (6-benzilaminopurina) e GA₃ (ácido giberélico) como tratamento pré-germinativo no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Dendrobium nobile*. Os tratamentos pré-germinativos consistiram de BAP e GA₃, separadamente, nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹. Após seis meses do semeio e permanência em câmara de germinação e crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (12 horas e 23 °C ± 2) as plântulas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto ao número, porcentagem de germinação, massa fresca, altura, diâmetro e número de pseudobulbos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos à análise de variância e quando significativos à regressão. As sementes de *D. nobile* germinaram mais na ausência de reguladores vegetais, e os tratamentos com BAP ou GA₃ na embebição das sementes influenciaram estatisticamente o desenvolvimento *in vitro* de *D. nobile*.

Palavras chaves: Orchidaceae, olho de boneca, cultivo *in vitro*, BAP, GA₃

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, durante o período cretáceo, quando em sua maioria as famílias das angiospermas tornaram-se diferenciadas (GARAY, 1972). Tal família está mais bem representada nas regiões tropicais e subtropicais (STOUTAMIRE, 1964), podendo crescer como epífitas sobre árvores e arbustos, ser rupículas, terrícolas ou saprófitas.

A espécie *Dendrobium nobile* Lindl, conhecida como olho de boneca, é uma orquídea herbácea, epífita, perene e entoucecada, originária da China e Himalaia. São citadas mais de 15 cultivares com flores de cores e tamanho variáveis, tolerantes ao frio, cuja multiplicação é geralmente feita por divisão de touceiras ou por keiks (LORENZI & SOUZA, 1999). 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).

A estrutura e o tamanho das sementes das Orchidaceae estão entre as características mais peculiares da família (DRESSLER, 1981). Para Stoutamire (1964), as sementes das orquídeas estão entre as de menor tamanho produzidas entre as fanerógamas e abrangem dimensões inferiores a 0,3 mm, sendo raras aquelas com mais de 2 mm.

Orchidaceae diferencia-se da maioria das famílias botânicas por suas sementes não possuírem reservas nutritivas suficientes para promover a germinação (RAMOS, 1969). Desta forma, na natureza, as sementes germinam em simbiose com fungos micorrízicos (ARDITTI, 1979), entretanto a utilização de meios de cultura no cultivo *in vitro* torna possível a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de orquídeas assimbioticamente.

Estudos sobre o processo de propagação de orquídeas são extremamente importantes, não apenas para que se possa melhorar sua produção, mas também para preservá-las, evitando sua extinção. Neste sentido, o cultivo *in vitro* é comprovadamente eficiente no aumento da germinação de sementes de várias espécies desta família, além de produzir plantas com excelente qualidade fitossanitária.

Há relatos de que os reguladores de crescimento são produzidos por fungos micorrízicos. Assim, é possível postular que essas substâncias podem ser fornecidas

pelo fungo durante a germinação simbiótica de sementes de orquídeas (MIYOSHI & MII, 1995).

As giberelinas estimulam a germinação de sementes não dormentes, além de favorecer a quebra da dormência. Esse hormônio promove a germinação atuando como mediador entre fatores ambientais e fatores internos restritivos da germinação; pode induzir genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios da semente ou ter efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião (KERBAUY, 2008).

No entanto, há outros reguladores vegetais envolvidos no processo da germinação, como as citocininas, que têm a capacidade de promover a germinação em algumas espécies, porém os efeitos do hormônio nesse processo ainda são pouco conhecidos (KERBAUY, 2008). Para as orquídeas, informações sobre a capacidade das citocininas promoverem a germinação são escassas.

As variações genéticas dentro da família Orchidaceae podem resultar em respostas diferentes ao uso de reguladores hormonais, tornando-se importante o seu estudo na espécie que se trabalha. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da embebição das sementes com BAP (6-benzilaminopurina) e GA₃ (ácido giberélico) no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *D. nobile*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA). Foram utilizadas como material de estudo sementes de *Dendrobium nobile* Lindl. produzidas por meio de autopolinização manual, cedidas pelo Orquidário da FCA, da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Cápsulas maduras da espécie foram abertas com o uso de estilete, e as sementes foram retiradas, homogeneizadas, pesadas e, 5 mg delas foram submetidas ao teste de tetrazólio que resultou em 800 sementes viáveis por mg de sementes. Após a confirmação da viabilidade procedeu-se os tratamentos pré-germinativos um com 6-benzilaminopurina (BAP) e outro com ácido giberélico (GA₃), ambos nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹.

2.1 Tratamento Pré-germinativo

Foram utilizados, tanto para BAP quanto para GA₃, 10 mL de cada concentração dos reguladores vegetais para a embebição de porções de 10 mg de sementes. Durante a embebição as oito suspensões de sementes foram armazenadas em ambiente desprovido de luz. Decorridas 24 horas as sementes foram lavadas com 50 mL de água destilada por três vezes mediante a utilização de papel filtro.

Cada porção de 10 mg de sementes foi transferida para Erlenmeyer, com auxílio de espátula e desinfestada por 15 minutos com uma solução composta por 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água destilada esterilizada em autoclave (CAMPOS, 2002). Decorrido este tempo a suspensão foi diluída para 50 mL com água destilada esterilizada em autoclave, no interior da câmara de fluxo laminar vertical, para realização do semeio *in vitro*.

2.2 Semeio *in vitro*

O meio de cultura utilizado para semeio foi o de Campos (2002) modificado pela substituição do adubo Dyna Gro por NPK e pela quantificação dos ingredientes, sendo composto por 70 g L⁻¹ de tomate maduro sem casca e sementes, 150

mL L⁻¹ de água de coco verde, 50 g L⁻¹ de banana nanica madura sem casca, 3 mL L⁻¹ de NPK 10-10-10, 17 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 25 g L⁻¹ de açúcar cristal e 3 g L⁻¹ de carvão ativado. Após homogeneização no liquidificador, o pH foi ajustado para 5,0 com KOH e 80 mL do meio de cultura foram transferidos para frascos de 600 mL providos de tampa metálica, sendo esterilizados em autoclave por 20 min a 120°C e 1 atm de pressão.

Solidificado o meio, os frascos foram transportados para câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada por 30 minutos com luz germicida, para realização do semeio *in vitro*. Em cada frasco foram inoculados, por meio de pipetador automático, 2 mL da suspensão de sementes que continham cerca de 320 sementes viáveis. Foram utilizados três frascos por tratamento.

Após o semeio os frascos foram tampados e lacrados com filme plástico, acondicionados em câmara de germinação e crescimento e mantidos por 6 meses a 23±2°C sob 12 horas de fotoperíodo com 28 µmol m⁻² s⁻¹ de irradiância, provenientes de lâmpadas brancas fluorescentes (40W).

2.3 Avaliação das variáveis e atributos vegetais

Decorridos seis meses do semeio, os frascos foram abertos e as plântulas foram lavadas em água corrente até total remoção do substrato. A seguir foram contados o número de plântulas e o número de protocormos. Para o cálculo da porcentagem de germinação foram considerados os protocormos e as plântulas. Para o número de plântulas foram consideradas apenas as plântulas que apresentassem sistema radicular e parte aérea identificáveis a olho nu.

A porcentagem de germinação foi calculada considerando-se o número médio de sementes viáveis identificadas pelo teste tetrazólio que foram inoculadas em cada frasco de cultivo.

As plântulas foram classificadas quanto à altura, sendo selecionadas as 26 plântulas mais representativas de cada tratamento para a avaliação dos atributos vegetais. Cada plântula foi avaliada quanto à massa fresca, altura, diâmetro e número de pseudobulbos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz.

2.4 Delineamento estatístico

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e cada regulador de crescimento foi analisado separadamente. Para análise da porcentagem de germinação e número de plântulas utilizou-se quatro tratamentos (0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹) com três repetições e para os atributos vegetais quatro tratamentos (0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹) com 26 repetições.

Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos à análise de variância e quando significativos à regressão (BANZATO & KRONKA, 1992) com a utilização do aplicativo computacional SISVAR (FERREIRA, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação e número de plântulas

Na Tabela 1 são apresentados os quadrados médios e as médias gerais das variáveis número de plântulas e porcentagem de germinação em função dos reguladores vegetais utilizados assim como sua significância pela análise estatística.

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de plântulas (NP) e porcentagem de germinação (G), em função das concentrações dos reguladores vegetais utilizados. Dourados, 2009.

FV	GL	Quadrados médios			
	BAP.....	GA ₃	
		NP	G	NP	G
Concentrações	3	29,25**	11,13**	18,62**	7,51**
Resíduo	8	3,77	1,12	0,52	0,26
CV(%)		24,20	22,55	8,03	9,80
Média Geral		73,25	22,89%	85,75	26,79%

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

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

^{ns} não significativo

A germinação das sementes foi observada 18 dias após o semeio, quando houve produção de clorofila pelos protocormos (Figura 1). Quando da avaliação da germinação, os protocormos apresentaram tamanhos variados, indicando que a germinação não foi homogênea. Segundo Carvalho & Nakagawa (2000), essa heterogeneidade provavelmente está relacionada à capacidade de germinação, que nos vegetais é distribuída no tempo de acordo com a intensidade de dormência de suas sementes.



FIGURA 1. Sementes intumescidas e protocormos de *D. nobile* Lind. em meio de cultura alternativo (aumento de 16x) Dourados, 2009.

A utilização de BAP e GA₃ na embebição das sementes de *D. nobile* propiciou porcentagem de germinação e número de plantas menores em relação ao tratamento sem reguladores vegetais (Figura 2). A concentração de 3,31 mg L⁻¹ de BAP, obtida por meio de regressão, propiciou os menores números de plântulas (5,36) e as menores taxas de germinação (1,68%), enquanto a ausência do regulador propiciou 148,29 plântulas com taxa de germinação de 46,47% (Figura 2A e 2B).

As sementes de *D. nobile* germinaram mais na ausência de BAP do que nos demais tratamentos pré-germinativos com esta citocinina. Resultados semelhantes foram observados por Miyoshi & Mii (1995), para *Calanthe discolor*, onde as maiores concentrações de BAP na embebição inibiram a germinação das sementes. Entretanto, a adição de 3,37 mg L⁻¹ de BAP combinada ou não com AIA e GA₃ em meio de cultura promoveu, segundo Pedroza et al. (2005), a porcentagem máxima de germinação de sementes de *Comparettia falcata*, indicando que além da concentração, a forma de utilização desse fitorregulador pode favorecer ou não a germinação de Orchidaceae.

Os resultados desse trabalho podem indicar que *D. nobile* já possui um adequado nível endógeno de citocininas, já que, como afirmam Manning & Van Staden, (1987) gotículas de lipídios são as únicas substâncias de reserva contidas no embrião das orquídeas, que dependem dessa classe hormonal para a mobilização desses lipídios, que são utilizados durante a germinação.

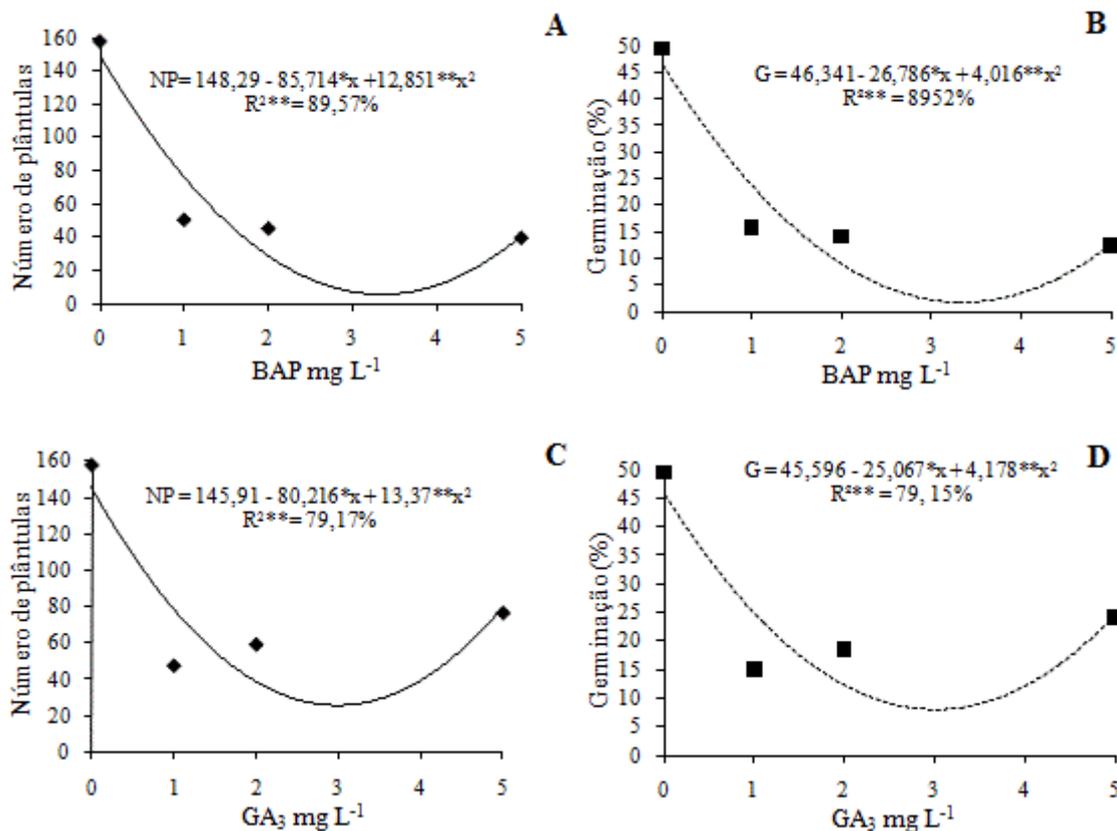


FIGURA 2. Número de plantas e porcentagem de germinação de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de reguladores hormonais utilizadas.

De maneira análoga ao BAP, a ausência de GA₃ na embebição de sementes proporcionou o maior número de plântulas (145,91) e a maior porcentagem de germinação (51,78%). Os menores resultados calculados para essas variáveis foram observados na concentração de 3,03 mg L⁻¹ de GA₃ que proporcionou 25,6 plântulas e taxa de germinação de 5,64% (Figura 2C e 2D).

A utilização de 1 mg L⁻¹ de GA₃ na embebição de sementes de *Cattleya bicolor* proporcionou maior número de plântulas nos estudos realizados por Santos et al. (2007), entretanto, os autores não encontraram diferenças estatísticas entre as doses estudadas (1; 2 e 5 mg L⁻¹) e a ausência do regulador sobre a taxa de germinação.

Mesmo a utilização das doses 10 e 100 mg L⁻¹ de GA₃ para embebição por 24 horas de sementes de *Calanthe discolor* avaliadas por Miyoshi & Mii (1995) não produziram efeitos significativos sobre a germinação de sementes e formação de protocormos dessa espécie.

Os resultados observados nesse trabalho vão de encontro ao relatado por Arditti & Ernst (1984), que atribuíram aos fornecimentos exógenos de giberelinas a inibição dos processos germinativos em Orchidaceae e, corroboram com os resultados de Miyoshi & Mii (1995), que acrescentaram que as sementes de *Calanthe discolor* podem ser muito sensíveis a GA₃, na fase inicial de germinação uma vez que o processo inibitório foi detectado com exposição ao fitorregulador por período de 24 horas.

Embora a utilização de GA₃ em tratamentos pré-germinativos tenham sido inibitórios para algumas Orchidaceae, Gil-Martínez et al. (1995) afirmam que, em condições naturais, as sementes dessa família podem precisar de GA₃ fornecido por um fungo micorrízico, a fim de iniciar o processo germinativo. Esta é possivelmente a razão pela qual GA₃ adicionado em meios assimióticos (que substituem as associações micorrízicas) tem sido importante, conforme relato de Pedroza et al. (2005), para a germinação de *Comparettia falcata*

As giberelinas são relatadas como benéficas à quebra de dormência embrionária (Grattapaglia & Machado, 1998; Jesus et al., 2003) ou tegumentar de muitas espécies vegetais (Kerbaui, 2008), entretanto os resultados observados nesse trabalho constataram o efeito inibitório e não estimulador de GA₃ na germinação de *D. nobile*.

3.2 Atributos vegetais

Na Tabela 2 são apresentados os quadrados médios e as médias gerais do número de folhas, número e diâmetro de pseudobulbos, número de raízes e comprimento da maior raiz, altura da planta e massa fresca de *D. nobile*, no final do experimento, em função do regulador vegetal BAP assim como sua significância pela análise estatística.

Os tratamentos pré-germinativos com BAP foram estatisticamente significativos para todos os atributos vegetais estudados, exceto diâmetro de pseudobulbos (Tabela 2).

TABELA 2. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), em função dos tratamentos com o regulador vegetal BAP. Dourados, 2009.

Quadrados Médios								
FV	GL	NF	NB	NR	CR	AP	MF	DB
BAP	3	2,68**	0,48*	1,41**	20,23**	5,47**	2,12**	0,03 ^{ns}
Resíduo	100	18,61	0,12	0,18	2,17	0,45	0,17	0,01
CV(%)		26,76	52,92	25,40	29,74	29,63	23,49	23,04
Média geral		5,50	2,10	6,01	4,95 cm	2,28 cm	0,73 g	0,52 cm

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

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

^{ns} não significativo

Conforme é possível observar na Figura 3, o número de folhas foi influenciado pelas concentrações da citocinina, apresentando um comportamento quadrático sendo os maiores valores (5,47 plântula⁻¹) observados com a utilização de 2,7 mg L⁻¹ de BAP. Na concentração 2,8 mg L⁻¹ foram observados os maiores números de pseudobulbos (2,35 plântula⁻¹), indicando que concentrações muito altas de citocinina na embebição das sementes podem inibir a formação dessas estruturas.

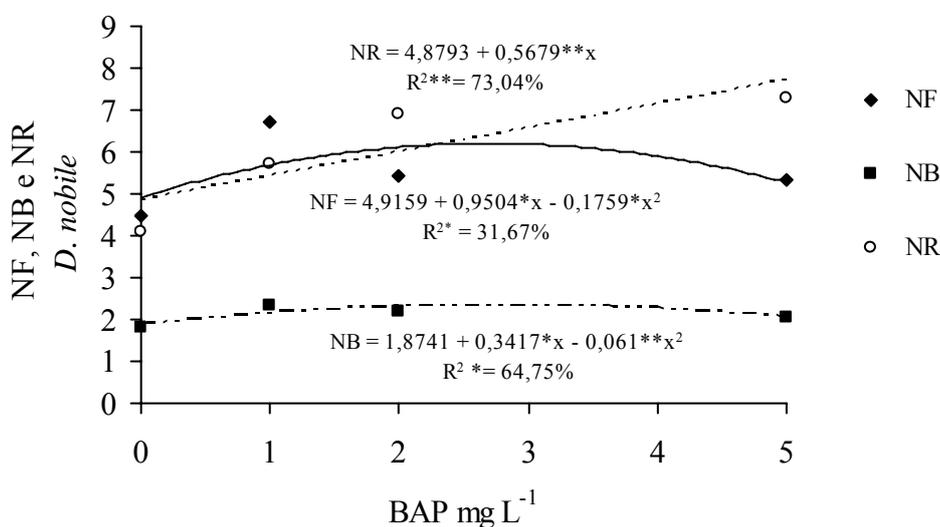


FIGURA 3. Número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e número de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas.

À medida que se aumentou as concentrações de BAP, maiores quantidades de raízes foram formadas. Os maiores números (7,3 plântula⁻¹) foram obtidos na concentração 5 mg L⁻¹ (Figura 3). Como expresso na Figura 4, a concentração 3,18 mg L⁻¹ de BAP propiciou os maiores valores de comprimento da maior raiz (6,09 cm) e, de acordo com Silva (2003), aumentar o comprimento das raízes é uma maneira da plântula buscar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. A partir daí houve decréscimo desse parâmetro, indicando que as reservas foram provavelmente direcionadas para outras partes da planta.

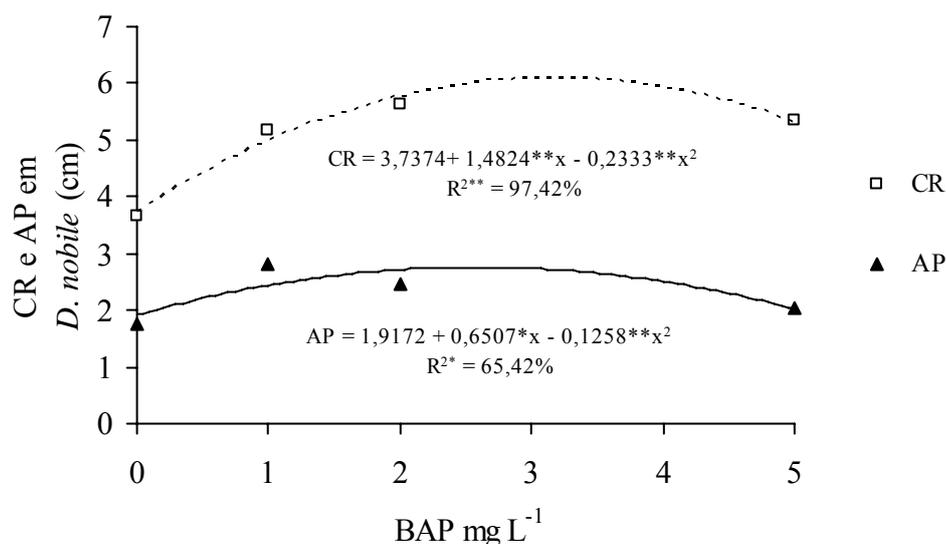


FIGURA 4. Comprimento da maior raiz (CR) e altura da planta (AP) de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas.

O parâmetro diâmetro de pseudobulbos, como mencionado anteriormente, não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de BAP utilizadas, sendo seus valores médios 0,51 plântula⁻¹.

As maiores alturas de planta (2,75 cm) foram registradas na concentração 2,5 mg L⁻¹ (Figura 4) e a maior massa fresca (1,11 g) foi propiciada pela concentração 3,1 mg L⁻¹ (Figura 5). Como o peso da massa fresca da plântula é uma referência de vigor, poder-se-ia estabelecer que a concentração de 2,5 mg L⁻¹ de BAP é a mais indicada para a embebição de sementes de *D. nobile* uma vez que para Zaerr & Mapes (1985), o BAP é a citocinina mais potente e menos dispendiosa para promover o desenvolvimento da parte aérea da plântula.

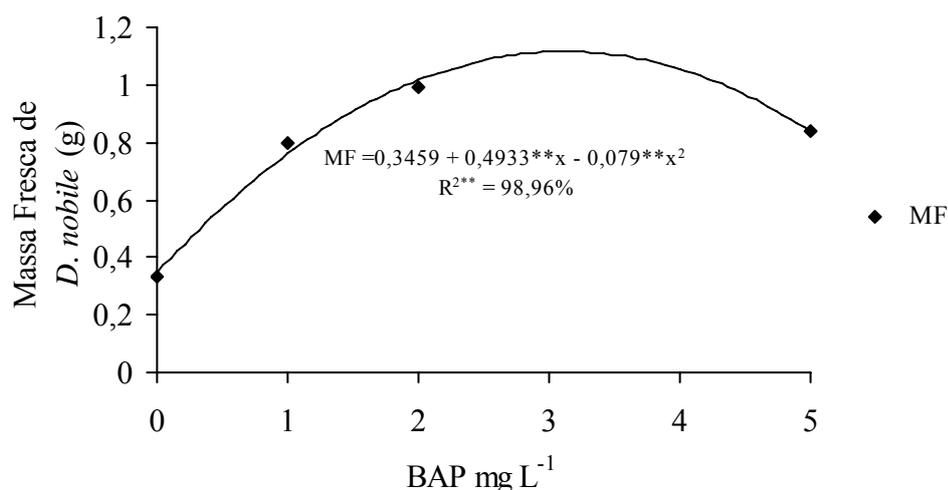


FIGURA 5. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de BAP utilizadas.

Na Tabela 3 são apresentados os quadrados médios e as médias gerais do número de folhas, número e diâmetro de pseudobulbos, número de raízes e comprimento da maior raiz, altura da planta e massa fresca, no final do experimento, em função do regulador vegetal GA₃ assim como sua significância pela análise estatística.

TABELA 3. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), em função dos tratamentos com o regulador vegetal GA₃. Dourados, 2009.

Quadrados Médios								
FV	GL	NF	NB	NR	CR	AP	MF	DB
GA ₃	3	1,49**	0,65**	0,45*	22,86**	2,41**	1,18**	0,01 ^{ns}
Resíduo	100	0,12	0,12	0,16	3,66	0,58	0,22	0,01
CV(%)		20,20	47,74	25,88	39,70	34,91	76,24	22,86
Média geral		6,29	2,21	5,16	4,82 cm	2,18 cm	0,62 g	0,49 cm

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

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

^{ns} não significativo

A embebição de sementes com GA₃ foi estatisticamente significativa para todos os atributos vegetais estudados, exceto diâmetro de pseudobulbos que apresentou

valor médio de 0,49 cm independentemente da dose estudada (Tabela 3). Para esse regulador hormonal, a concentração de 2,9 mg L⁻¹ propiciou os maiores números de folhas (7,99 plântula⁻¹), já na concentração 3,2 mg L⁻¹ foram observados os maiores números de pseudobulbos (2,54 plântula⁻¹).

Hew & Clifford (1993) relatam que o uso das giberelinas no desenvolvimento de plântulas de orquídeas tem uma consequência negativa levando à clorose das folhas e menor número embora com maior comprimento, podendo também afetar o surgimento do sistema radicular, indicando que durante a germinação, as sementes sintetizam a quantidade necessária de giberelinas, de modo que qualquer adição altera a concentração supraótima anteriormente existente. Entretanto, os resultados observados no presente trabalho indicam que aplicações de GA₃ entre 2 e 3 mg L⁻¹ em tratamentos pré-germinativos são favoráveis, em *D. nobile*, aos parâmetros citados.

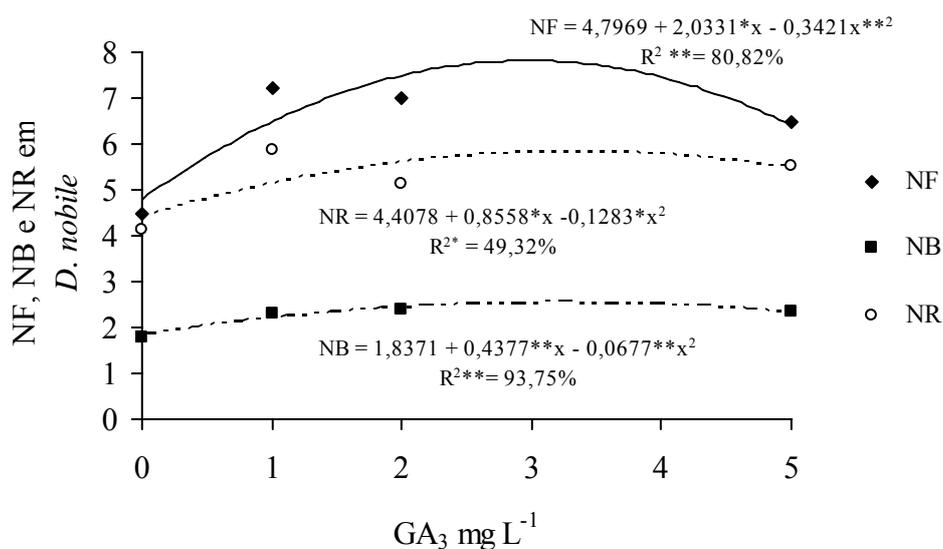


FIGURA 6. Número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e número de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas.

Para número de raízes, os maiores valores (5,83 plântula⁻¹) foram obtidos na concentração 3,3 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 6). As concentrações de giberelina também promoveram influência positiva no comprimento da maior raiz, onde a maior concentração utilizada (5 mg L⁻¹), propiciou os maiores valores (5,80 cm) (Figura 7).

Esses dados corroboram com informações de Salisbury & Ross (1992), que relatam que a giberelina pode favorecer o desenvolvimento radicular.

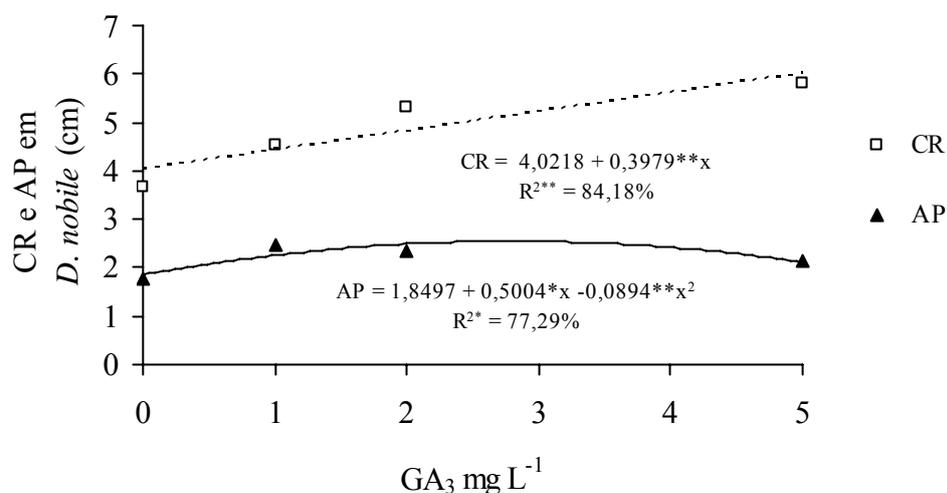


FIGURA 7. Comprimento da maior raiz (CR) e altura da planta (AP) de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas.

As maiores alturas de planta (2,55 cm) foram encontradas na concentração 2,8 mg L⁻¹ (Figura 7), e a maior massa fresca (0,825 g) foi propiciada pela concentração 3,5 mg L⁻¹, de GA₃ (Figura 8) . Concentrações maiores dessa giberelina passaram a inibir o ganho de peso das plântulas.

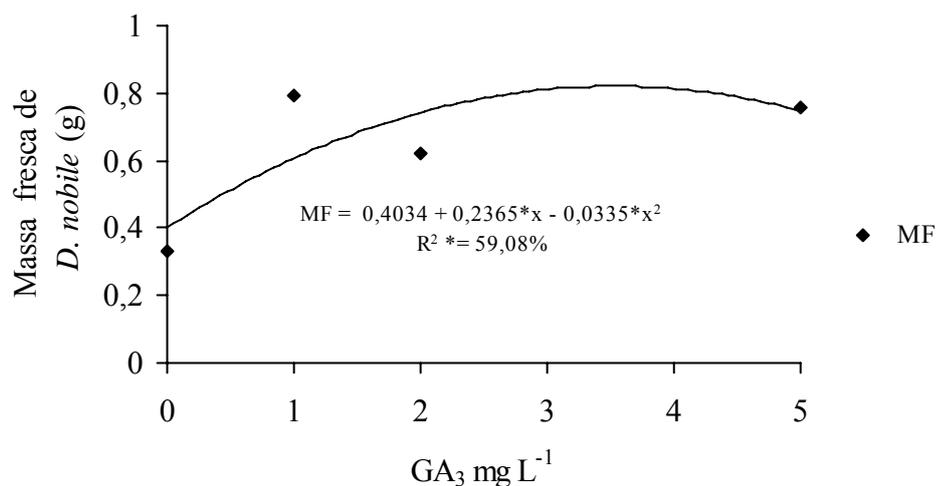


FIGURA 8. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de *D. nobile*, em função das concentrações de GA₃ utilizadas.

O efeito estimulatório da giberelina observado na altura da planta, provavelmente, deveu-se ao fato de que, nos vegetais, esse fitorregulador participa de muitas atividades fisiológicas importantes, como o estímulo à expansão longitudinal das células, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar (KERBAUY, 2008).

A baixa exigência de ácido giberélico verificada para estas variáveis pode ser explicada pelo fato dos embriões possuírem capacidade de produzir certa quantidade deste fitohormônio, como foi verificado por Jimenez et al. (2001).

4. CONCLUSÕES

Os resultados observados nesse trabalho mostraram que, mesmo tendo diminuído a taxa de germinação das sementes e proporcionado menores números de plântulas, o tratamento pré-germinativo com 2 mg L⁻¹ de BAP e GA₃ na embebição das sementes beneficiou posteriormente o desenvolvimento *in vitro* de *D. nobile*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: J. Arditti (Editor), **Orchid Biology, Reviews and Perspectives**, 3. Cornell University Press, New York, p. 170-222, 1984.

ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research**. v. 7, p. 421-655, 1979.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247 p.

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

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CROCOMO, O. J.; CABRAL, J. B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília, DF: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1988. 39 p.

DRESSLER, R. L. **The orchids: Natural History and classification**. Harvard University Press. 1.ed. 1981. 332 p.

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de Experimentos - SISVAR. **Universidade Federal de Lavras**. 2003

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**. Harvard University. v. 53, p. 202-215, 1972.

GIL-MARTÍNEZ, F. **Elementos de fisiología vegetal**. España: Mundi-Prensa. 1995. 1147p.

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: Embrapa-CNPq, p.183-260, 1998.

HEW, C.S.; CLIFFORD, P.E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**. v13, p. 231-239, 1993.

JIMENEZ, V. M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in habituated nucellar Citrus callus during the initial stages of regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 92-100. 2001.

JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 288, p.183-189, 2003.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 431p.

LORENZI, L.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1999. 1088p.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some african orchids. **Australian Journal of Botany** v.35 p. 43-353, 1987.

MIYOSHI, K.; MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v.63, n.3-4, p.263-267, 1995.

PEDROZA, J.; FERNÁNDEZ, C.; SUÁREZ, A. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under in vitro conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.41, p.838-843, 2005.

RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução por semente**. São Paulo: Ed. Saraiva, 1969. 163p.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4. ed. California: Wadsworth, 1992. 682p.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. de P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. da C. **Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas in vitro de orquídeas. Iniciação científica**. CESUMAR, v.09, n.1, p.07-12, 2007.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassiocattleya Pastoal* x *Laeliocattleya Amber Glow***. Dissertação. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2003. 62p.

STOUTAMIRE, W. P. Seeds and seedling of native orchids. **Michigan Botanist**, v. 3, n. 4, p.104-19, 1964.

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.

ZAER J.B.; MAPES M. O. Action of growth regulators. In: BONGA JM; DURZAN DJ. (eds). **Tissue culture in forestry**. Martinus Nijhoff Publishers, p.231-255, 1985. ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: J. Arditti (Editor), **Orchid Biology, Reviews and Perspectives**, 3. Cornell University Press, New York, pp. 170-222. 1984.

**CAPÍTULO II – EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE
ÁGUA DE COCO NO MEIO DE CULTURA, NA GERMINAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Dendrobium nobile* Lindl.**

RESUMO. O objetivo do trabalho foi determinar o volume de água de coco, que, acrescido ao meio de cultura proposto por Campos (modificado pela utilização de 70 g de tomate sem casca e sementes, 50 g de banana nanica sem casca, 3 mL de NPK 10-10-10, 17 g de ágar bacteriológico, 25 g de açúcar cristal, 3 g de carvão ativado, água de coco nos volumes 0; 50; 100; 150 e 200 mL L⁻¹ e água destilada para completar um litro) proporcionou melhor germinação e cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. Foram utilizadas como material de estudo sementes de *D. nobile* produzidas mediante autopolinização manual. Após seis meses do semeio e permanência em câmara de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (12 horas e 23°C ± 2), as plântulas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto ao número, porcentagem de germinação, massa fresca, altura, diâmetro e número de pseudobulbos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos à análise de variância e quando significativos à regressão. A adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura propiciou os melhores resultados para altura de plantas, número de raízes, número de pseudobulbos e massa fresca de *D. nobile*.

Palavras-chave. Orchidaceae, água de coco, cultivo *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos utilizados no cultivo *in vitro* possuem a capacidade de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas e são formados por sais inorgânicos, possuindo ainda sacarose como fonte de carboidrato, aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas (DIXON, 1985).

Na literatura existem referências sobre vários ensaios e muitos meios de cultura que têm sido testados visando melhorar essas etapas. Contudo, os resultados são muitas vezes divergentes e nem sempre é possível a reprodução dos mesmos. Isto se deve, principalmente, ao fato de que as técnicas de cultivo *in vitro* necessitam ser adaptadas às necessidades das espécies, pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo (FORTES & PEREIRA, 2001).

Vários elementos aditivos complexos como água de coco, peptona e polpa de banana foram utilizados nos meios de cultura para micropropagação ou germinação de sementes de orquídeas visando melhoria nos resultados do cultivo *in vitro*. Entretanto, os dados comparativos disponíveis não permitem uma conclusão definitiva sobre o efetivo estímulo ao crescimento promovido por esses elementos (GEORGE, 1993).

A água de coco, em geral utilizada de 3 a 15% na composição dos meios de cultura, é o aditivo que mais tem sido utilizado para um grande número de espécies cultivadas *in vitro*, não somente para estimular o crescimento de calos, mas também para aumentar a germinação assimbiótica, formação de embriões somáticos, induzir a divisão de grãos de pólen e o desenvolvimento de embriões imaturos (CALDAS et al., 1998).

A água de coco é o endosperma de *Cocos nucifera*, rica em nutrientes e de grande importância na germinação da sua semente e na sobrevivência da plântula. Contém sais minerais, mio-inositol e hormônios, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (CALDAS et al., 1998), que são constituintes da maioria dos meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro*.

Sua composição básica apresenta 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, vitaminas e sais minerais, grau brix igual a 7,0 (a 21°C) e pH em água igual a 4,8. Segundo Aragão (2001), 100 mL de água de coco contém 4,4 g de glicose; 0,37 mg

de proteínas: 6,2 mg de fósforo; 175 mg de potássio; 17,5 mg de cálcio; 8,5 mg de magnésio; 10,5 mg de sódio; 0,06 mg de ferro e 57 mg de vitamina C.

Vários protocolos contendo diferentes meios nutritivos foram propostos para as orquídeas (VUNAJOVIC et al., 2000; MARTINI et al., 2001; ROY & BANERJEE, 2002; PARK et al., 2003), no entanto, mudanças nos protocolos são necessárias para atender às necessidades específicas de cada material genético (CALDAS et al., 1998).

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar o volume de água de coco, que, acrescido ao meio de cultura de Campos (2002), propiciou melhor germinação e cultivo *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA). Foram utilizadas como material de estudo sementes de *Dendrobium nobile* Lindl. produzidas mediante autopolinização artificial realizada manualmente, cedidas pelo Orquidário da FCA, da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Cápsulas maduras da espécie foram abertas com o uso de estilete, e as sementes foram retiradas, homogeneizadas, pesadas e, 5 mg delas foram submetidas ao teste de tetrazólio que resultou em 800 sementes viáveis por mg de sementes. Após a confirmação da viabilidade procedeu-se o semeio *in vitro*.

2.1 Semeio *in vitro*

Utilizou-se um meio de cultura proposto por Campos (2002), modificado pela utilização de 70 g de tomate sem casca e sementes, 50 g de banana nanica sem casca, 3 mL de NPK 10-10-10, 17 g de ágar bacteriológico, 25 g de açúcar cristal, 3 g de carvão ativado, água de coco nos volumes 0; 50; 100; 150 e 200 mL L⁻¹ e água destilada para completar um litro.

Após homogeneização no liquidificador, o pH foi ajustado para 5,0 com KOH e 80 mL do meio de cultura foi transferido para frascos de 600 mL providos de tampa metálica, sendo em seguida esterilizados 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 30 minutos, para realização do semeio *in vitro*.

Foram utilizadas 10 mg de sementes, desinfestadas por 15 minutos com uma solução composta por 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água destilada esterilizada em autoclave (CAMPOS, 2002). Decorrido este tempo a suspensão foi diluída para 50 mL com água destilada esterilizada em autoclave, no interior da câmara de fluxo laminar vertical. Em cada frasco foram inoculados, por meio de pipetador

automático, 2 mL da suspensão de sementes que continham cerca de 320 sementes viáveis. Foram utilizados três frascos para cada tratamento.

Após o semeio os frascos foram tampados e lacrados com filme plástico, acondicionados em câmara de germinação e crescimento e mantidos por 6 meses a $23\pm 2^\circ\text{C}$ sob 12 horas de fotoperíodo com $28\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, provenientes de lâmpadas brancas fluorescentes (40W).

2.2 Avaliação das variáveis e atributos vegetais

Decorridos seis meses do semeio, foram contabilizadas as plântulas e os protocormos produzidos. A porcentagem de germinação foi calculada levando-se em conta o número médio de sementes viáveis inoculados em cada frasco, e o número de protocormos e plântulas existentes. Já para o número de plântulas foram consideradas apenas as plântulas que apresentassem sistema radicular e parte aérea identificáveis a olho nu.

As plântulas, após a completa remoção do substrato, foram classificadas quanto à altura, sendo selecionadas 26 plântulas de cada tratamento para a avaliação dos atributos vegetais. Cada plântula foi avaliada quanto à massa fresca, altura, diâmetro e número de pseudobulbos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz.

2.3 Delineamento estatístico

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para análise da porcentagem de germinação e número de plântulas utilizou-se cinco tratamentos (0; 50; 100; 150 e 200 mL L⁻¹ de água de coco) com três repetições e para os atributos vegetais cinco tratamentos (0; 50; 100; 150 e 200 mL L⁻¹) com 26 repetições.

Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos à análise de variância e quando significativos à regressão (BANZATO & KRONKA, 1992) com a utilização do aplicativo computacional SISVAR (FERREIRA, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os quadrados médios e as médias gerais das variáveis, número de plântulas e porcentagem de germinação de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizadas, assim como sua significância pela análise estatística.

TABELA 1. Resumo das análises de variância do número de plântulas (NP) e porcentagem de germinação (G), observados no final do período experimental. Dourados, 2009.

		Quadrados Médios	
FV	GL	NP	G
Água de coco	4	3,54 ^{ns}	1,09 ^{ns}
Resíduo	10	1,48	0,45
CV(%)		9,35	9,22
Média geral		170,86	53,39%

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

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

^{ns} não significativo

A utilização de diferentes volumes de água de coco no meio de cultura não proporcionou diferença estatística significativa no número de plântulas e porcentagem de germinação de *D. nobile* (Tabela 1) (Figura 1A e 1B).

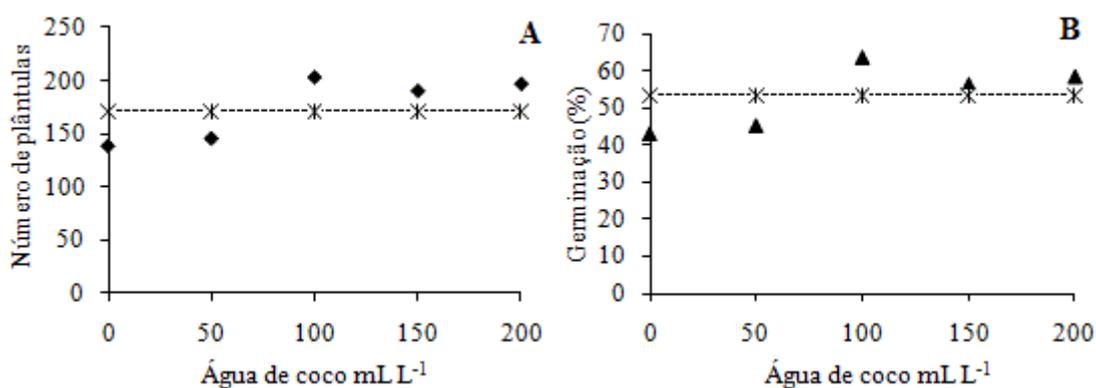


FIGURA 1. Valores médios do número de plântulas (A) e taxa de germinação (%) (B) de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados.

Na carência de trabalhos que relatem resultados de porcentagem de germinação e número de plântulas de orquídeas, algumas citações com culturas nas quais a água de coco foi utilizada serão discutidas no texto.

Os resultados obtidos corroboram com os de Nunes et al. (2008) que, estudando pinhão-mansão, relataram que a adição de água de coco e carvão ativado ao meio de cultura não influenciou o percentual de germinação, com média de 81%. Em contrapartida, Pinheiro et al. (2001) observaram que a suplementação do meio de cultivo com água de coco limitou a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*).

Na Tabela 2 são apresentados os quadrados médios e as médias gerais do número de folhas, número e diâmetro de pseudobulbos, número de raízes e comprimento da maior raiz, altura da planta e massa fresca, no final do experimento, em função dos volumes de água de coco utilizados, assim como sua significância pela análise estatística.

TABELA 2. Resumo das análises de variância do número de folhas (NF), número e diâmetro de pseudobulbos (NB e DB), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), altura da planta (AP) e massa fresca (MF), observados no final do período experimental. Dourados, 2009.

		Quadrados Médios						
FV	GL	NF	NB	NR	CR	ALT	MF	DB
Água de coco	4	0,72**	0,11*	1,39**	6,59*	2,60**	0,05**	0,02*
Resíduo	125	0,14	0,04	0,17	3,75	0,22	0,004	0,008
CV(%)		14,96	11,4	18,03	38,89	26,39	5,76	21,71
Média geral		5,79	2,16	4,56	4,98	1,78 cm	0,37 g	0,42 cm

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

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

^{ns} não significativo

A adição de água de coco no meio de cultura foi estatisticamente significativa para todos os atributos vegetais estudados (Tabela 2).

Conforme expresso na Figura 2, o número de folhas foi diretamente influenciado pelas concentrações de água de coco, sendo que na concentração 200 mL L⁻¹ foram encontrados os maiores números (6,92 plântula⁻¹). O resultado obtido corrobora com o de Nunes et al. (2008) que, em pinhão-mansão, verificou aumento linear

do número de folhas por plântula, em relação a concentrações crescentes de água de coco. Já Araújo et al. (2006), trabalhando com *Cattleya loddigesii* ‘Grande’ x *Cattleya loddigesii* ‘Alba’, observou maior número de folhas (8,36 plântula⁻¹) quando foram adicionados 100 mL L⁻¹ de água de coco ao meio Knudson C (1946). A maior concentração utilizada pelos autores foi 200 mL L⁻¹.

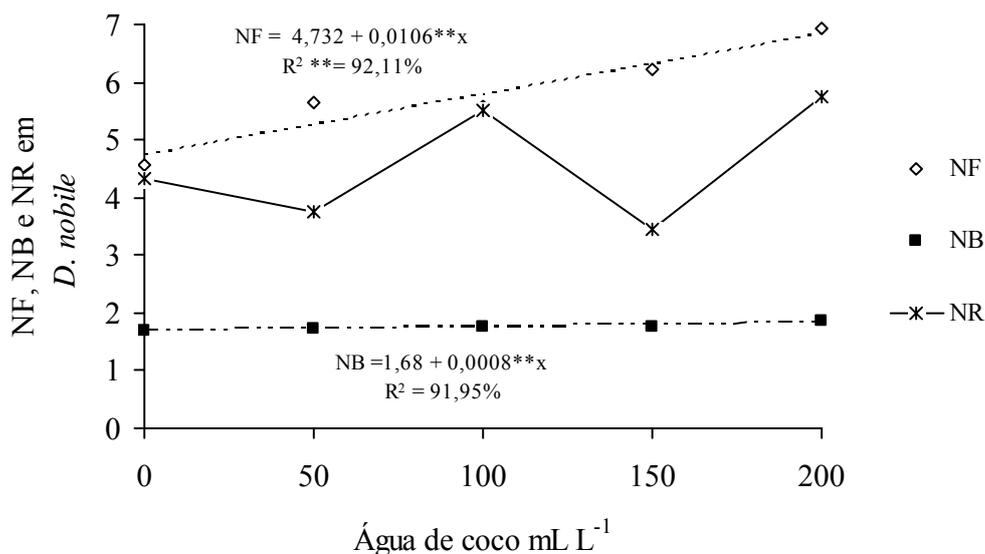


FIGURA 2. Valores estimados de número de folhas (NF), número de pseudobulbos (NB) e valores observados de raízes (NR) de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados.

O aumento linear do número de folhas se deve aos hormônios existentes na água de coco, principalmente as citocininas, que atuam na promoção do desenvolvimento caulinar, conseqüentemente aumentando o número de folhas das plantas, como sugere Caldas *et al.* (1998), quando diz que a água de coco, adicionada ao meio de cultura, fornece açúcares, vitaminas, aminoácidos, fitorreguladores e outros metabólitos essenciais às culturas.

O número de pseudobulbos também apresentou comportamento linear, sendo os maiores valores (1,86 plântula⁻¹) obtidos com a utilização da concentração 200 ml L⁻¹ de água de coco (Figura 2). Martínez & García (2007), enriquecendo com 120 mL L⁻¹ de água de coco e 100 g L⁻¹ de banana o meio de cultura MS, obtiveram os melhores resultados para número de pseudobulbos de *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae).

O maior número de raízes foi observado com a utilização de 200 ml L⁻¹ de água de coco e os menores com 50 ml L⁻¹ (Figura 2).

De maneira semelhante, Araújo et al. (2006), obtiveram o maior número de raízes (6,5 plântula⁻¹) em *Cattleya loddigesii* ‘Grande’ x *Cattleya loddigesii* ‘Alba’, utilizando o meio de cultura Knudson C (1946), acrescido de 200 mL L⁻¹ de água de coco, também o maior volume utilizado, combinado com 100 g L⁻¹ de polpa de banana, embora os autores também relatem efeitos satisfatórios para esse atributo, com a utilização de 50 mL L⁻¹.

Como expresso na Figura 3, o volume de 131,43 mL L⁻¹ propiciou os maiores valores calculados de comprimento da maior raiz (5,40 cm) sendo os menores valores (4,19 cm) registrados na ausência da água de coco. Volumes superiores a 131,43 mL L⁻¹ induziram redução no comprimento da maior raiz indicando que as reservas da planta foram provavelmente direcionadas para outras partes da planta ou para a formação de novas raízes.

O atributo diâmetro de pseudobulbos apresentou uma resposta quadrática, sendo seus menores valores (0,30 cm) observados com a utilização de 81,6 mL L⁻¹ e os maiores valores (0,72 cm) com a adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura.

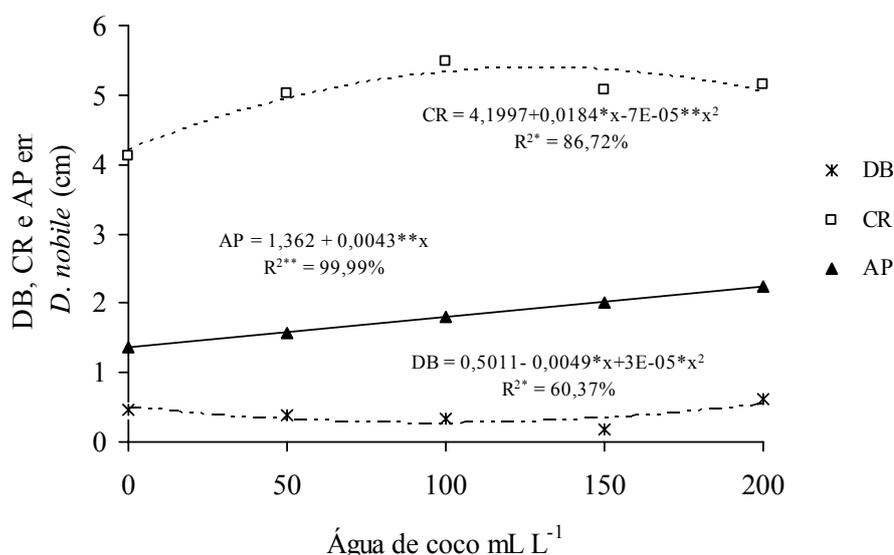


FIGURA 3. Altura da planta (AP), comprimento de raízes (CR) e número de pseudobulbos (NP) de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados.

Também foi registrado efeito linear crescente dos volumes de água de coco sobre a altura das plântulas, sendo calculados valores de 2,23 cm com a utilização de 200 mL L⁻¹ de água de coco (Figura 3).

Simões et al. (1999), estudando o efeito de diferentes meios de cultura, água de coco e carvão ativado na propagação *in vitro* de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp., observaram maior crescimento da parte aérea quando foi acrescentado o maior volume de água de coco estudado pelos autores (100 mL L⁻¹) ao meio Knudson C (1946) .

De maneira análoga, Martínez & García (2007), encontraram que, em *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae), a adição de 120 mL L⁻¹ de água de coco e 100 g L⁻¹ de banana ao meio de cultura, também proporcionou os melhores resultados para altura de plantas e, Sinha & Roy (2004) encontraram os melhores resultados para altura de plântulas de *Vanda teres* ao agregar 10% (v/v) de água de coco e 10% de polpa de banana ao meio de cultivo.

Vieira et al. (2009) estudando a micropropagação de *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii* observaram os melhores resultados para altura da parte aérea e comprimento da maior raiz, nos tratamentos com 100 mL L⁻¹ de água de coco, independente da quantidade de polpa de banana utilizada, sendo que, na ausência de água de coco, as plântulas mostraram o menor crescimento destes parâmetros.

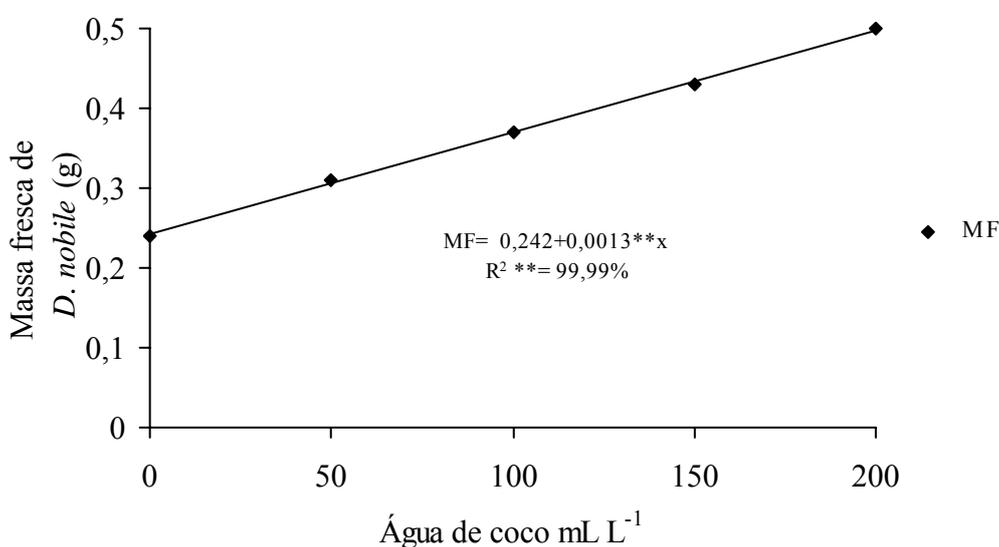


FIGURA 4. Massa fresca (MF), em gramas, de plantas de *D. nobile*, em função dos volumes de água de coco utilizados.

Comportamento linear crescente também foi observado para a massa fresca da porção caulinar de *D. nobile* em relação aos volumes de água de coco. Os maiores valores de massa fresca (0,5g) para *D. nobile* foram propiciados pela utilização de 200 mL L⁻¹ de água de coco (Figura 4). Resultado semelhante, em relação ao volume de água de coco adicionado ao meio de cultivo, foi observado por Araújo et al. (2006), que também registraram maiores valores para massa fresca de *Cattleya loddigesii* ‘Grande’ x *Cattleya loddigesii* ‘Alba’ com a utilização do maior volume de água de coco estudado (200 mL L⁻¹) combinados com 100 g L⁻¹ de polpa de banana.

Acréscimos de 200% em massa fresca de plântulas de *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii*, foram relatados por Vieira et al. (2009), com a adição de 100 g L⁻¹ de polpa de banana + 100 mL L⁻¹ de água de coco ao meio MS e acréscimos de 55% em relação à testemunha foram registrados na massa fresca de *Cattleya amethystoglossa* por Dronk (2004), com a suplementação de 150 g L⁻¹ de polpa de banana nanica e 150 mL L⁻¹ de água de coco no meio de cultura

O efeito benéfico da adição de água de coco sobre os atributos vegetais avaliados nesse trabalho, pode ser explicado pelos elevados teores de glicose, frutose e sais minerais que ela contém, além de hormônios vegetais, necessários ao processo de formação e desenvolvimento das plântulas (NUNES et al., 2008). Além disso, deve-se considerar também o *status* nutricional e hormonal endógeno de cada material de estudo, ressaltando a necessidade de estudos específicos em relação à espécie vegetal de interesse bem como ao propósito de sua utilização na promoção quer da germinação, organogênese ou embriogênese *in vitro*.

Corroborando com os resultados de outros pesquisadores, que indicam que para cada espécie há uma concentração ótima de água de coco a ser adicionada no meio de cultura para estimular o desenvolvimento, a adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco estimula o crescimento de *D. nobile*, levando à obtenção de melhores resultados para altura de plantas, número de raízes, número de pseudobulbos e massa fresca.

4. CONCLUSÕES

Os resultados observados nesse trabalho mostraram que embora a utilização de água de coco não promova alteração no número de plântulas e porcentagem de germinação de *D. nobile*, a adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura propicia os melhores resultados para altura de plantas, número de raízes, número de pseudobulbos e massa fresca de plantas, sendo este volume recomendado para germinação assimiótica de *D. nobile*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. **Água de coco**. Aracaju: Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros, Série Documentos 24, 2001. 32p.
- ARAUJO, A. G. ; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo in vitro de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, v.53: p.608-613, 2009.
- BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP. 1992. 247p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/ CNPH. v. 1. p. 87-132, 1998.
- CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON R. R. **Plant Cell Culture: A Pratical Approach**. Washington DC: IRL Press, p.1-20, 1985.
- DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo in vitro de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchib. f.** Dissertação – Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004. 30p.
- FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de Experimentos - SISVAR. **Universidade Federal de Lavras**, 2003.
- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento in vitro da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture, part 1 – The technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**. v. 14, p.214- 217, 1946.
- MARTÍNEZ, D. M.; GARCÍA, R. A. M. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina* bateman (Orchidaceae). **Foresta Veracruzana**, Universidad Veracruzana Xalapa, México, v. 9, n. 2, p. 27- 32, 2007.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, 2001.

NUNES, C. F.; DALILHIA, M. P.; SANTOS, N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAÚJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v.164, p. 919-923, 2003.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALOUFA, M. A. I. Germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 181-192, 2002.

SINHA P., ROY S. K. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through in vitro culture. **Plant Tissue Culture**, v. 14, p. 12-17. 2004.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K. ; NAGASHIMA, G T.; FARIA, R. T. ; AGUIAR, R. S. Propagação in vitro e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48 – 52, 2009.

VUJANOVIC, V. et al. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany**, v. 86, p. 79-86, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados observados nesse trabalho mostraram que:

1- a embebição das sementes em BAP e GA₃ além de diminuir a taxa de germinação das sementes e números de plântulas proporciona pouco efeito no desenvolvimento *in vitro* de *D. nobile* não sendo recomendada para essa espécie;

2- embora a utilização de água de coco não promova alteração no número de plântulas e porcentagem de germinação de *D. nobile*, a adição de 200 mL L⁻¹ de água de coco ao meio de cultura propicia os melhores resultados para altura de plantas, número de raízes, número de pseudobulbos e massa fresca de plantas, sendo este volume recomendado para germinação assimbiótica de *D. nobile*.