

Seleção de genótipos de *Dendrobium phalaenopsis* (Orchidaceae) nas fases de propagação *in vitro* e aclimatização

Selection of *Dendrobium phalaenopsis* (Orchidaceae) genotypes in the *in vitro* propagation and acclimatization phases

Alessandro Borini Lone¹; Cristiane Muniz Barbosa²; Ricardo Tadeu de Faria^{3*}; Lúcia Sadayo Assari Takahashi⁴; Inês Cristina de Batista Fonseca⁵

Resumo

A hibridação de orquídeas é realizada para propiciar a produção de cultivares de interesse comercial que apresentem alto vigor, grande número de flores e variabilidade de cores. O trabalho teve por objetivo a seleção de genótipos de *Dendrobium phalaenopsis* favoráveis para a propagação *in vitro* e aclimatização, resultantes de cruzamentos e autofecundações de plantas matrizes selecionadas. Foram utilizadas 56 plantas de *D. phalaenopsis* para a realização dos cruzamentos e autofecundações, totalizando 109 combinações. Dos 109 cruzamentos e autofecundações realizados, apenas 13 cruzamentos e 3 autofecundações apresentaram número de plântulas suficientes para as avaliações. Após cinco meses, 15 plântulas de cada cruzamento e autofecundação foram submetidas à avaliação das características: comprimento da parte aérea, número de raízes, peso da massa fresca total, comprimento da maior raiz e número de brotações. As demais foram plantadas em bandejas de isopor e após quatro meses foi avaliado a taxa de sobrevivência. O genótipo mais favorável para propagação *in vitro* e aclimatização foi o cruzamento DF18 x DF13.

Palavras chave: Autofecundação, polinização artificial, taxa de sobrevivência

Abstract

The hybridization of orchids have been done to propitiate a production of cultivars with commercial interesting that show high vigor, great number of flowers and variability of colors. This research had the objective to select favorable genotypes of *Dendrobium phalaenopsis* for *in vitro* propagation and acclimatization, resulted from crossing and self-fertilizations of selected plants matrix. For the realization of crossing and self-fertilizations 56 plants of *D. phalaenopsis* were utilized, totalizing 109 combinations. From the 109 crossing and self-pollinations, only 13 crossing and 3 self-pollinations showed enough number of seedlings for an evaluation. After five months, 15 seedlings from each crossing and self-pollinationss were evaluated by the following characteristics: length of the aerial part, number of roots, weight of the total fresh mass, length of the biggest root and number of buds. The others seedlings were planted in trays of styrofoam and after four months the rate of survival were evaluated. The most favorable genotype for the *in vitro* propagation and acclimatization was the crossing DF18 x DF13.

Key words: Self-fertilizations, artificial pollination, survival tax

¹ Acadêmico de Biologia da UEL, Bolsista CNPq.

² Acadêmica de Biologia da UEL.

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética, Professor Associado do Departamento de Agronomia da UEL. Londrina, PR. Email: faria@uel.br

⁴ Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia, Professora Adjunta do Departamento de Agronomia da UEL. Londrina, PR.

⁵ Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia, Professora Adjunta do Departamento de Agronomia da UEL. Londrina, PR.

* Autor para correspondência

Introdução

Os taxonomistas apontam a existência de cerca de 25.000 espécies de orquídeas e mais de 100.000 híbridos (SHEEHAN; SHEEHAN, 1994). A família das orquídeas é amplamente distribuída, são encontradas em todos os continentes e em variados climas, exceto em regiões polares e em desertos extremamente secos. Nos países de clima temperado predominam as terrestres e nos de clima quente as epífitas e as rupículas (MILLER; WARREN, 1996).

As orquídeas do gênero *Dendrobium* são originárias da Índia, podendo ser encontradas na Ásia tropical e subtropical, prolongando-se para leste até as ilhas Fiji e sul da Austrália (SUTTLEWORTH; HEBERT; GORDON, 1994). Compreende mais de 1500 espécies, sendo um gênero complexo e amplo. Swartz em 1800 fez a primeira descrição do gênero (SHEEHAN; SHEEHAN, 1994).

A espécie *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. normalmente apresenta flores largas, com labelo pontiagudo, pseudobulbos e folhas verde escuras. Podem ser epífitas ou litófitas, e necessitam de umidade, alta luminosidade e boa drenagem ao redor das raízes para um bom desenvolvimento (SCHELPE; STEWART, 1990).

A hibridação de orquídeas é realizada de forma artificial em casa de vegetação e visa à produção de cultivares de interesse comercial que apresentem alto vigor, grande número de flores e variabilidade de cores (PRAKASH; GOH, 1996). Segundo Davidson (1994), a hibridação do gênero *Dendrobium* é realizada para propiciar a floração precoce, estender a época de floração, expandir o número de flores, cores e formas.

Para a obtenção de linhagens puras do gênero *Dendrobium* há necessidade de um longo período, assim, é comum no melhoramento genético o cruzamento e autofecundação entre híbridos selecionados, visando à obtenção de novas cultivares (KERBAUY, 1995).

A partir da obtenção das cultivares é importante a multiplicação das plantas. Segundo Kamemoto, Amore e Kuhnle (1999), um dos métodos é a propagação *in vitro* devido à facilidade, rapidez além da obtenção de plântulas livres de vírus. Para a propagação de orquídeas em larga escala é fundamental a seleção de genótipos e o estabelecimento de meios de cultura adequados para a sua germinação e crescimento em condições de laboratório (KERBAUY, 1995; ARDITTI; ERNEST, 1993).

O trabalho teve por objetivo a seleção de genótipos de *Dendrobium phalaenopsis* favoráveis para a propagação *in vitro* e aclimatização, resultantes de cruzamentos e autofecundações de plantas matrizes selecionadas.

Material e Métodos

As plantas de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg (Orchidaceae) utilizadas neste trabalho foram selecionadas de acordo com características comerciais como porte da planta, coloração, número e tamanho de flores e época de florescimento. Os cruzamentos foram realizados em plantas cultivadas em telados cobertos com sombrite 50% e a germinação no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Estadual de Londrina.

Foram utilizadas 56 plantas de *Dendrobium phalaenopsis* para a realização dos 75 cruzamentos e 34 autofecundações, totalizando 109 combinações.

As flores foram polinizadas artificialmente, após nove meses as cápsulas foram coletadas, e após a desinfestação com água sanitária comercial com teor de cloro ativo de 2,0 a 2,5 % por 10 minutos, as sementes foram retiradas das cápsulas e germinadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), modificado com a metade da concentração dos macronutrientes, acrescentado 1g/L de carvão ativado (SATINDER; SARMA, 1997) e 7 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 e distribuído 50

mL de meio de cultura em cada frasco de vidro com capacidade de 250 mL. Após seis meses as plântulas foram repicadas em meio MS, com a mesma composição descrita anteriormente, com 10 plântulas por frasco. A germinação e repicagem foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Os frascos foram etiquetados e vedados com filme de PVC e mantidos em ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz (lâmpada fluorescente), 2.000 lux de luminosidade e temperatura de 25°C.

Após cinco meses, 15 plântulas de cada cruzamento e autofecundação foram avaliadas: comprimento da parte aérea (cm), medido a partir do colo da planta; número de raízes; peso da massa fresca total (g); comprimento da maior raiz (cm); número de brotações. As demais foram plantadas em bandejas de isopor medindo 25,5 x 25,5 (cm) de largura e 4,7 (cm) de altura contendo casca de pinus peneirada + bolinhas de isopor (3:1) e a taxa de sobrevivência das plântulas (%) foi avaliada após quatro meses.

Os dados de taxa de sobrevivência foram convertidos em proporções e submetidos à análise de várias proporções em Qui-quadrado a 5% de probabilidade utilizando o programa BioEstat versão 2.0. Comprimento da parte aérea, número de raízes, peso da massa fresca, comprimento da maior raiz e número de brotações foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Dos 75 cruzamentos e 34 autofecundações realizados, apenas 14 cruzamentos e três autofecundações apresentaram número de plântulas suficientes para as avaliações.

A partir dos dados obtidos foi possível verificar que o melhor resultado para as características comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de brotações e peso da massa fresca total durante a propagação *in vitro* ocorreu nas plantas procedentes do cruzamento DF18 x DF13 com média de altura de $5,51 \pm 0,75$ cm (Tabela 1). Para as autofecundações o melhor resultado ocorreu nas plantas procedentes da autofecundação DF92 diferindo estatisticamente das autofecundações DF44 e DF19 na característica número de raízes com média de $15,13 \pm 2,57$ raízes por planta (Tabela 2).

Para os cruzamentos, a característica comprimento da parte aérea, as plantas procedentes do cruzamento DF72 x DF69 apresentaram a maior média, com média de $6,89 \pm 0,94$ cm, não diferindo estatisticamente das plantas procedentes dos cruzamentos DF40 x DF14 e DF18 x DF13, porém apresentaram baixos valores médios para as variáveis comprimento da maior raiz ($2,16 \pm 0,45$ cm) e número de brotações ($0,67 \pm 0,26$ brotos), quando comparado com as plantas procedentes do cruzamento DF18 x DF13 que apresentaram valor médio para comprimento da maior raiz de $4,80 \pm 0,99$ cm e valor médio de número de brotações de $1,47 \pm 0,58$ brotos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), número de brotações (NB) e peso da massa fresca total (MFT) das progênies dos cruzamentos de plântulas de *Dendrobium phalaenopsis* e taxa de sobrevivência (TS) na fase de aclimatização.

Genótipos	Características					
	CPA (cm) ¹	CMR(cm) ¹	NR ¹	NB ¹	MFT (g) ¹	TS (%) ²
DF09 x DF10	4,61 bcd	3,99 abc	10,93 ab	1,60 abc	0,63 a	25,00 d
DF13 x DF19	5,14 bc	2,62 cd	9,73 ab	1,07 abcde	0,42 abcde	69,09 bc
DF14 x DF40	4,51 bcd	3,46 abcd	10,20 ab	1,40 abcd	0,33 bcde	83,91 ab
DF18 x DF13	5,51ab	4,80 a	9,27 ab	1,47 abcd	0,57 ab	87,50 ab
DF19 x DF49	4,80 bcd	2,14 d	10,20 ab	1,13 abcde	0,35 abcde	85,94 ab
DF32 x DF19	4,23 bcd	3,44abcd	8,20 bc	1,13 abcde	0,38 abcde	65,00 bc
DF34 x DF59	4,23 bcd	4,67abcd	11,13 ab	1,67 ab	0,45 abcd	56,67 bcd
DF38 x DF13	4,81 bcd	2,55 cd	8,87 b	0,93 bcde	0,30 cde	45,00 cd
DF39 x DF59	3,57 d	3,57 abc	11,73 ab	2,07 a	0,34 bcde	88,57 ab
DF40 x DF14	5,31ab	3,10 bcd	12,87 a	0,80 cde	0,39 abcde	74,78 b
DF53 x DF50	4,09 bcd	2,55 cd	10,20 ab	1,07 abcde	0,23 e	70,00 bc
DF72 x DF19	3,77 cd	2,29 cd	5,20 c	0,80 de	0,25 de	94,83 a
DF72 x DF69	6,89 a	2,16 d	9,20 ab	0,67 e	0,46 abc	67,27 bc
C. V. (%)	13,71	20,73	17,02	39,35	23,68	

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem, entre si, significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados por raiz quadrada.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem, entre si, pelo teste Qui-quadrado para várias proporções a 5% de probabilidade. P = 0,72; Q (1-P) = 0,27; Qui-quadrado = 97,59; Graus de liberdade = 12.

Tabela 2. Valores médios do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), número de brotações (NB) e peso da massa fresca total (MFT) das progênies das autofecundações de plântulas de *Dendrobium phalaenopsis* e taxa de sobrevivência (TS) na fase de aclimatização.

Genótipos	Características					
	CPA(cm) ¹	CMR(cm) ¹	NR ¹	NB ¹	MFT(g) ¹	TS(%) ²
DF19	4,46 a	2,48 a	9,93 b	1,13 a	0,42 a	92,03 a
DF44	7,86 a	2,35 a	10,13 b	1,20 a	0,35 a	88,68 a
DF92	4,43 a	2,24 a	15,13 a	1,33 a	0,51 a	51,35 b
C.V.(%)	31,72	16,08	17,02	38,63	21,45	

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados por raiz quadrada.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado para várias proporções a 5% de probabilidade. P = 0,85; Q (1-P) = 0,15; Qui-quadrado = 38,02; Graus de liberdade = 2.

As plantas procedentes do cruzamento DF72 x DF19 apresentaram a menor média para a variável número de raízes ($5,20 \pm 0,88$ raízes), não diferindo estatisticamente da média das plantas procedentes do cruzamento DF32 x DF19. As plantas do cruzamento DF72 x DF19 apresentaram valor médio baixo para a variável comprimento da parte aérea quando comparadas com as plantas procedentes dos cruzamentos DF72 x DF69, DF18 x DF13 e DF40 x DF14, e valor médio inferior para a variável comprimento da maior raiz, quando comparadas com as plantas do cruzamento DF18 x DF13. Para o número de brotações, as plantas do cruzamento DF72 x DF19, apresentaram média inferior às plantas procedentes dos cruzamentos DF39 x DF59, DF34 x DF59 e DF09 x DF10. Para peso da massa fresca total, as plantas procedentes do cruzamento DF72 x DF19, apresentaram média inferior às plantas dos cruzamentos DF72 x DF69, DF18 x DF13 e DF09 x DF10.

No cruzamento recíproco das plantas DF14 e DF40, não houve diferenças significativas para as variáveis avaliadas (Tabela 1). Em seu trabalho, Faria et al. (2004) também não encontraram diferenças significativas para as variáveis comprimento da parte aérea, peso da massa fresca total e peso da massa seca total em cruzamento recíproco de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae).

Após quatro meses da aclimatização foi possível verificar que os cruzamentos que apresentaram os melhores resultados para a taxa de sobrevivência foram: DF72 x DF19, DF39 x DF59, DF19 x DF49, DF18 x DF13 e DF14 x DF40 (Tabela 1). Para as autofecundações os melhores resultados para a fase de aclimatização ocorreram em DF19 e DF44 (Tabela 2). As plantas procedentes da autofecundação DF92, que apresentaram os melhores resultados na propagação *in vitro*, apresentaram também baixa porcentagem na taxa de sobrevivência (51,35%) (Tabela 2).

As menores taxas de sobrevivência, foram observadas nas plantas procedentes dos cruzamentos

DF09 x DF10, DF34 x DF59 e DF38 x DF13 (Tabela 1). Segundo Tombolato e Costa (1998) a fase de aclimatização é muito delicada, não só porque representa um estresse para a plântula, mas também, pelo perigo de infecções por fungos e bactérias que podem se desenvolver neste estágio. Plântulas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam características morfofisiológicas diferentes quando comparadas àquelas que cresceram diretamente no campo ou em casa de vegetação, fator responsável pela sua baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* (PREECE; SUTTER, 1991).

Segundo Costa (1998), um fator importante que contribui para a maior sobrevivência das plântulas submetidas às condições *ex vitro* refere-se a seu estado nutricional. Porém o que foi verificado é que a morte das plantas foi precedida pela a morte das raízes. As plantas sobreviventes apresentavam desenvolvimento de algumas das raízes existentes ou emissão de novas raízes.

Debergh e Maene (1981), em seu trabalho com diversas plantas ornamentais, dentre elas Bromeliaceae e várias espécies do gênero *Ficus* (Moraceae), observaram que, quando as plantas são examinadas aproximadamente duas semanas após o transplantio, as raízes produzidas em meio de cultura tinham, na maioria dos casos, morrido, e outras tinham começado a se desenvolver, indicando que, para algumas espécies, as raízes *in vitro* não são funcionais após transferência para a condição *ex vitro*.

Segundo Pierik (1990), a maioria das espécies de plantas cultivadas *in vitro* têm, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida, devido à alta umidade relativa (90 a 100%) que ocorre *in vitro*. As folhas das plantas *in vitro* são geralmente tenras, fotossinteticamente pouco ativas e apresentam cutícula pouco espessa, por isso, sofrendo estresse hídrico, o que ocasiona na morte das mudas que foram transplantadas, ou seja, mal adaptadas às condições que irão encontrar na aclimatização.

Conclusão

O genótipo mais favorável para propagação *in vitro* e aclimatização foi o cruzamento DF18 x DF13.

Referências

- ARDITTI, J.; ERNEST, R. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Ed.). *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 63-67.
- DAVIDSON, B. Dendrobium breeding trends. *American Orchid Society Bulletin*, West Palm Beach, v. 63, p. 638-645, 1994.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.
- FARIA, R. T.; VICENTE, A. P. R. M.; COSTA, T. M. M.; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (*Orchidaceae*) na fase de propagação *in vitro*. *Semina*, Londrina, v. 25, n. 2, p. 221-226, 2004.
- KAMEMOTO, H.; AMORE, T. D.; KUHNLE, A. R. *Breeding dendrobium: orchids in Hawaii*. Canadá: University of Hawai'i Press, 1999.
- KERBAUY, G. B. Biofábrica de orquídeas. In: GERALD, L. T. S. (Ed.). *Biofábrica produção industrial de plantas "in vitro"*. Araras: Ed. da UFSCar, 1995. p. 22-24.
- MILLER, D.; WARREN, R. *Orquídeas do alto da Serra da Mata Atlântica pluvial do sudeste do Brasil*. Rio de Janeiro: Salamandra, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa, 1990.
- PRAKASH, L. C. L.; GOH, C. J. In vitro propagation of commercial orchids: an assessment of current methodologies and development of a novel approach thin section culture. *Journal of the Orchid Society of India*, Bangalore, v. 10, p. 31-41, 1996.
- PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.
- SATINDER, K.; SARMA, C. M. Selection of best medium for *in vitro* propagation of *Dendrobium lindleyi* Steud. *Advances in Plant Sciences*, Muzaffarnagar, v. 10, n. 1, p. 1-5, 1997.
- SCHELPE, S.; STEWART, J. *Dendrobiums: an introduction to the species in cultivation*. Stour Provost: Orchid Sundries, 1990.
- SHEEHAN, M.; SHEEHAN, T. *Illustrated survey of orchid genera*. New York: Press Syndicate of University of Cambridge, 1994.
- SUTTLEWORTH, F. S.; HEBERT, S. Z.; GORDON, W. D. *Orquídeas: guia dos orquidófilos*. 5.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. (Boletim Técnico, 174).