

Germinação e crescimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em diferentes meios de cultivo e períodos de exposição a agentes desinfestantes seminais

Victor Ramos Cavalcante, Larissa Borin & Cristiano Pedroso-de-Moraes

Centro Universitário Hermínio Ometto, Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500, Jd. Universitário, Araras, CEP 13607-339, São Paulo, Brasil.
cpmoraes@gmail.com

Recebido em 08.X.2016

Aceito em 01.VIII.2018

DOI 10.21826/2446-8231201873212

RESUMO - *Epidendrum secundum* Jacq. é uma orquídea comercializada e utilizada em ornamentação, portanto, o cultivo *in vitro* caracteriza-se como uma técnica importante, pois proporciona rapidez, redução de custos e maior produtividade. O presente trabalho avaliou a germinação de sementes e o crescimento *in vitro* de *E. secundum*, oriundas de autopolinização, em três meios de cultivo distintos, MS formulado com a metade da concentração de macronutrientes, meio Kyoto e meio à base de fertilizante comercial Peters® (NPK 09-45-15) a 2 g.L⁻¹. As sementes foram expostas a hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 5% para desinfestação por: 2,5; 5; 7,5 e 10 minutos. Ao final do experimento, a análise estatística das variáveis avaliadas, evidenciou que a interação entre uso do hipoclorito de cálcio como substância desinfestante, nos períodos de exposição de 5 e 10 min., com o meio

MS ½ macronutrientes são os mais indicados para o cultivo *in vitro* da espécie.

Palavras-chave: germinação assimbiótica, micropropagação, hipoclorito de cálcio

ABSTRACT - *In vitro* germination and growth of *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) in different culture media and periods of exposition to seminal disinfectant agents. *Epidendrum secundum* is an orchid commercialized and used for ornamental purposes; thus *in vitro* culture is highly important, since it is fast, low cost and has high productivity. This work evaluated the *in vitro* germination and growth of *E. secundum*, derived from self pollination in 3 distinct culture media: MS formulated with half macronutrient concentration, Kyoto medium and a medium formulated with Peters® fertilizers, a commercial fertilizer (NPK 09-45-15) at 2 g.L⁻¹. The seeds were exposed to calcium hypochlorite (5%), sodium hypochlorite (5%) for disinfection over 2.5; 5; 7.5 and 10 minutes. At the end of the experiment, we found that the interaction between the use of calcium hypochlorite (5%) as a disinfectant, in 5 and 10 min. exposure time, with MS ½ macronutrients are the most suitable for the *in vitro* cultivation of this species.

Keywords: asymbiotic germination, *in vitro* germination, calcium hypochlorite

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae apresenta na atualidade 26.972 espécies reconhecidas (Pridgeon 2014), divididas em aproximadamente 800 gêneros (Atwood 1986, Pridgeon 2014), dentre os quais se destaca a subfamília Epidendroideae e o gênero neotropical *Epidendrum* L. por apresentar-se como um dos mais expressivos ecológica e horticulturalmente, possuindo cerca de 1.000 espécies, com distribuição pela América Latina (Chen *et al.* 2002). Mesmo com toda a relevância ornamental do gênero, produtores de *Epidendrum* encontram dificuldades no desenvolvimento da cultura, como custos elevados e taxa de propagação sexual e vegetativa muito lenta para a produção em larga escala (Chen *et al.* 2002).

Epidendrum secundum Jacq., possui hábito terrestre e/ou rupícola (Caiafa & Silva 2005) e é uma das espécies mais significativas e populares do gênero, sendo comercializada como flor de corte e de vaso e, amplamente utilizada na

produção de híbridos multifloros, fato este decorrente da ampla capacidade autogâmica da espécie (Pansarin & Amaral 2008, Massaro *et al.* 2012). Tal espécie foi considerada altamente polimórfica recentemente, apresentando entre suas populações ampla variação morfológica (Pinheiro & Barros 2007).

Para aumentar e aperfeiçoar a produção de mudas com alta qualidade genética, o cultivo *in vitro* vem sendo empregado e a simplificação de meios de cultura surge como alternativa para reduzir os gastos na produção (Stancato 2001, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b; Silva *et al.* 2014, Gollo *et al.* 2016), pois a formulação dos meios de cultivo, para a propagação de orquídeas, pode ser feita de acordo com as necessidades de cada espécie (Faria *et al.* 2002). Muitos meios vêm sendo produzidos com o acréscimo de fertilizantes comerciais para facilitar sua preparação (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b). Tal facilitação foi apontada em estudo comparativo entre os meios MS (Murashige & Skoog 1962), Knudson C

(Knudson 1946), Vacin & Went (Vacin & Went 1949) e à base de fertilizantes NPK (10-5-5) e (10-30-20), para os quais muitas das variáveis fitotécnicas analisadas para as espécies *Catasetum fimbriatum* Lindl. e *Cyrtopodium paranaensis* Schult. mostraram-se mais satisfatórias em comparação às formulações comumente utilizadas para orquídeas (Oliveira & Faria 2005).

Além desses meios de cultivo convencionais, outras alternativas têm sido desenvolvidas como a formulação de meios de cultura desenvolvidos a base de vinhaça (i.e., efluente originado da produção do etanol de cana-de-açúcar), os quais além de promover a redução de custos, por utilizarem grande parte dos nutrientes minerais da vinhaça, também são ecologicamente corretos devido a ser uma nova forma racional de descartar a vinhaça, que é um resíduo extremamente poluente ao meio ambiente (Silva *et al.* 2014, Gollo *et al.* 2016).

A nutrição balanceada nas fases iniciais de desenvolvimento proporcionam às plantas cultivadas *in vitro* alto vigor fisiológico, traduzido em maior resistência a patógenos e às adversidades do meio ambiente, além do rápido crescimento. Deste modo, a composição do meio de cultura e o agente desinfestante de sementes são de expressiva importância para a germinação e o crescimento de plantas (Kerbaui 1997). Sob esta ótica, a desinfestação é indispensável em cultivo *in vitro*, visto que a presença de microrganismos como fungos e bactérias acarretam sérios problemas de produtividade, dentre eles a má formação das plântulas e inclusive a morte das mesmas (Hartmann & Kester 1978, Patricio *et al.* 1995).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos meios de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962), com metade da concentração de macronutrientes, Kyoto (Kano 1965) e de meio à base do fertilizante comercial Peters®, bem como a influência de diferentes períodos de exposição a dois agentes desinfestantes, na germinação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *E. secundum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Morfologicamente a espécie se caracteriza por possuir folhas dísticas, coriáceas, ovadas a lanceoladas e planas de ápice arredondado a agudo, rizoma curto e caule cilíndrico pendente. As inflorescências são do tipo corimbo apresentando de 16 a 57 cm de comprimento com variação de 12 a 80 flores, podendo ser mais compridas que o próprio caule. As flores, geralmente mantendo um padrão no tamanho, apresentam sépalas e pétalas variando entre lilás e rosa. O labelo é plano, delgado, trilobado, apresentando lobos laterais suborbiculares a deltoide de margem recortada com lobo mediano retangular a deltoide de margem denticulada e ápice levemente mucronulado, apresentando coloração alva e/ou amarela (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009b). A floração ocorre entre setembro e janeiro (Dodson & Frymire 1961, Dodson 1962, Pansarin & Amaral 2008).

Para a realização deste trabalho, cinco flores de diferentes indivíduos terrícolas de *Epidendrum secundum* foram previamente autopolinizadas artificialmente em Agosto de 2012. Um semestre após a autopolinização, foram coletadas cápsulas maduras, as quais foram levadas ao Laboratório de Botânica e Análises Ambientais do Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS para o início dos experimentos germinativos.

Preparo dos meios de cultivo

Foram preparados três meios de cultura distintos, sendo o primeiro composto por metade da concentração de macronutrientes e totalidade de micronutrientes e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog 1962), o segundo pelo meio Kyoto (Kano 1965) e, o terceiro à base do fertilizante Peters® (NPK 09-45-15) a 2 g.L⁻¹. Todos os meios foram acrescidos de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, 30 g.L⁻¹ de sacarose com pH ajustado para pH 5,8 antes da adição de 7 g.L⁻¹ de ágar-banana. Posteriormente, 50 mL de cada meio de cultura foram vertidos em quatro frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 kgf.cm⁻² de pressão durante 20 minutos (Arditti & Ernest 1992).

Desinfestação e semeadura

As sementes foram desinfestadas mediante a agitação constante em tubos *eppendorf*® pelos períodos de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 minutos em soluções de hipocloritos de sódio e de cálcio a 5%. Em seguida, os tubos contendo as sementes foram mergulhados em álcool 70% por 5 minutos e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas três vezes em água destilada com o auxílio de seringa de 1 mL (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009b). As sementes, então, após decantação nos *eppendorf*®, foram depositadas nos frascos contendo os meios de cultivo com a assistência de uma seringa e 1 mL de água destilada (Arditti & Ernest 1992). Foram semeados 10 frascos por tratamentos sendo inoculadas, por recipiente, 0,01 g de sementes (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009b). Os frascos semeados foram fechados com tampa plástica transparente. Posteriormente estes foram mantidos durante 180 dias em câmara climática (B.O.D. MA 403), à temperatura constante de 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 116 μmol.m⁻²s⁻¹.

Variáveis analisadas e análise estatística

Após 180 dias de cultivo foram avaliados os parâmetros relacionados à quantidade de frascos contaminados, à germinação e crescimento. A porcentagem de Frascos Contaminados (PFC%) foi estimada utilizando-se a totalidade dos frascos. Para a obtenção de todos os demais dados, foram usados quatro frascos escolhidos aleatoriamente, contendo um 0,01 g de sementes (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b), sendo então avaliados a Germinabilidade (G%) até 100 dias de cultivo *in vitro* (sendo considerada como planta germinada aquela que apresentou expansão foliar), Índice de Velocidade de Germinação

(IVG) (Labouriau & Agudo 1987), Comprimento Total da Plântula (CTP), Comprimento da Maior Raiz (CMR) e da Maior Folha (CMF), Diâmetro do Pseudobulbo (DP), Peso da Matéria Fresca (PMF) e Seca da plântula inteira (PMS), Número de Folhas (NF) e de Raízes (NR), utilizando paquímetro digital (Digimess 100A) e balança analítica (Gehaka BG 400) (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009b).

Após os testes de homogeneidade dos dados e a realização de ANOVA, com resultado significativo, os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão polinomial utilizando-se o aplicativo estatístico BioEstat 5.3. Para escolha do modelo de regressão que melhor se ajustasse aos dados observados, levou-se em consideração o fato de o desvio da regressão ser não significativo e o modelo de maior ordem apresentar grau significativo e, por último, o valor do coeficiente de determinação (R^2) (Fernandes *et al.* 2012).

RESULTADOS

Porcentagem de frascos contaminados (PFC%)

De todos os frascos semeados apenas os meios Kyoto com sementes desinfestadas com NaClO por período de 2,5 minutos e MS, composto por metade da concentração de macronutrientes, desinfestado com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por período de 7,5 minutos apresentaram 20% de contaminação fúngica.

Variáveis analisadas

Com relação às variáveis analisadas (Fig. 1), pode-se constatar que para a G%, todas as substâncias e períodos de desinfestação e meios de cultivo, apresentaram elevado valor de R^2 , com exceção das sementes desinfestadas em NaClO e germinadas em meio MS formulado com a metade da concentração de macronutrientes, o qual obteve o pior resultados dentre os tratamentos ($R^2 = 0,45$, $p < 0,05$).

Em contrapartida, os melhores resultados obtidos, com relação à substância desinfestante, foram os encontrados para NaClO em meio Peters® em período de 5 minutos ($R^2 = 0,82$, $p < 0,05$) e meio Kyoto em 10 min. ($R^2 = 0,96$, $p < 0,05$), respectivamente. Para o IVG (Figura 1), o melhor resultado obtido foi o observado para a desinfestação em NaClO durante 5 min., em meio de cultivo Peters® ($R^2 = 0,82$, $p < 0,05$), sendo o pior desempenho encontrado para a desinfestação em $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 10 min. em meio MS ½ macronutrientes ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$).

A análise estatística relacionadas às variáveis foliares, demonstram que para NF (Figura 2), a substância desinfestante mais eficiente foi o $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ em período de exposição de 10 min., no meio de cultivo MS ½ macronutrientes ($R^2 = 0,87$, $p < 0,05$) e para CMF (Fig. 2), foi observado a maior eficiência da mesma substância desinfestante e meio de cultivo, variando-se apenas o período de exposição, sendo este de 2,5 min. ($R^2 = 1$, $p < 0,05$).

As regressões polinomiais realizadas para as variáveis radiciais apontam que para NR (Fig. 3), o meio de cultivo MS ½ macronutrientes, apresentou-se, como o mais eficaz, sendo que os maiores valores de R^2 foram obtidos tanto para a desinfestação das sementes em NaClO ($R^2 = 0,88$, $p < 0,05$), por 7,5 min., quanto para $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 10 min. ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$). Entretanto para CMR (Figura 3), observou-se melhor desempenho em meio MS ½ macronutrientes, em $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 5 min. ($R^2 = 0,7537$, $p < 0,05$).

Para a variável CTP (Fig. 4), as análises de regressão polinomial indicaram que o melhor resultado obtido foi para o uso do meio de cultivo MS ½ macronutrientes, com as sementes tendo sido desinfestadas em $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 2,5 min. ($R^2 = 0,94$, $p < 0,05$). Contudo, para DP (Fig. 4), obteve-se que a desinfestação em $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, apresentou em consonância com o meio Peters®, em período de exposição de 10 min. ($R^2 = 0,98$, $p < 0,05$), seguido do meio MS ½ macronutrientes, por 5 min. ($R^2 = 0,7$, $p < 0,05$), os melhores resultados.

Com relação à PMF (Fig. 5), pode-se observar que o melhor resultado obtido foi para a desinfestação com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 2,5 min. em meio de cultivo MS ½ macronutrientes ($R^2 = 0,81$, $p < 0,05$). Já, para PMS (Figura 5), o uso de NaClO, no mesmo meio de cultivo e período de exposição de PMF, apresentaram os melhores resultados ($R^2 = 0,80$, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Porcentagem de frascos contaminados (PFC%)

Um dos maiores problemas da produção em escala comercial de orquídeas é a contaminação do meio de cultivo por fungos e bactérias durante as etapas de propagação *in vitro*. A contaminação estabelece-se no meio competindo com o vegetal pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento (Sousa *et al.* 2007).

Os agentes líquidos mais comumente usados para a desinfestação seminal em cultivo *in vitro* de orquídeas são os hipocloritos de cálcio e sódio, pois apresentam ampla eficiência na eliminação de microrganismos (Hartmann & Kester 1978, Agrios 1997, Faiad *et al.* 1997, Montarroyos 2000). Entretanto, na literatura, encontra-se o uso de diferentes concentrações de hipocloritos para desinfestações, sendo descrito desde 0,4 a 5% (Alvarez-Pardo *et al.* 2006, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b, Cordeiro *et al.* 2011, Cunha *et al.* 2011, Chiapim & Moraes 2012, Dezan *et al.* 2012, Massaro *et al.* 2012, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2012). Sugere-se que o aumento na concentração dos agentes desinfestantes, apesar de apresentar maior eficiência na eliminação de microrganismos, também acarreta na diminuição do percentual germinativo (Alvarez-Pardo *et al.* 2006), como pode ser observado na Figura 1A.

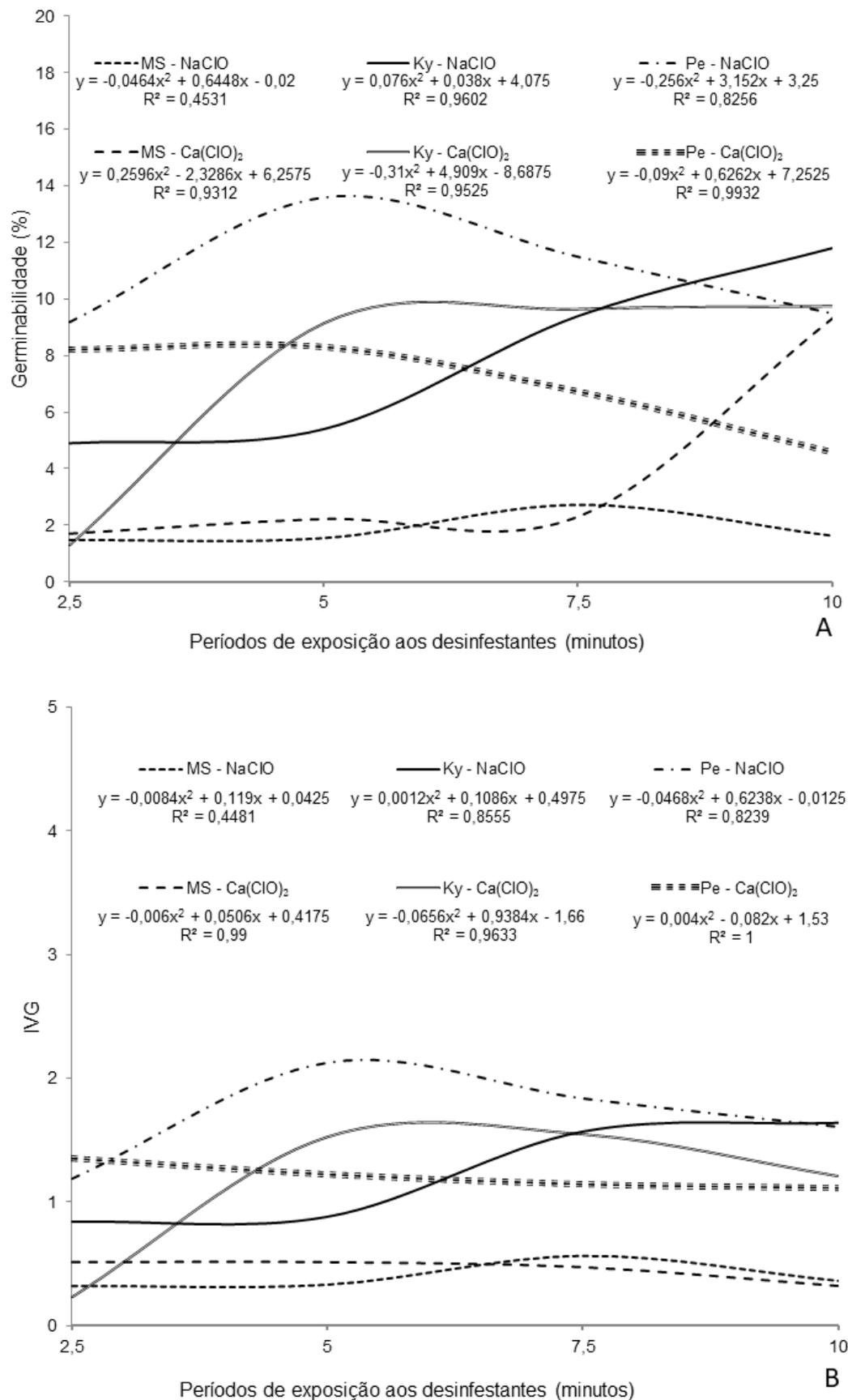


Fig. 1. Germinabilidade (G%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG após 180 dias de cultivo *in vitro*, com relação a meios de cultivo e períodos de exposição à diferentes concentrações de NaClO e Ca(ClO)₂ em sementes de *Epidendrum secundum*. MS = Meio de Murashige & Skoog (1962), Ky = Meio Kyoto de Kano (1965), Pe = Meio à base de fertilizante Peters®.

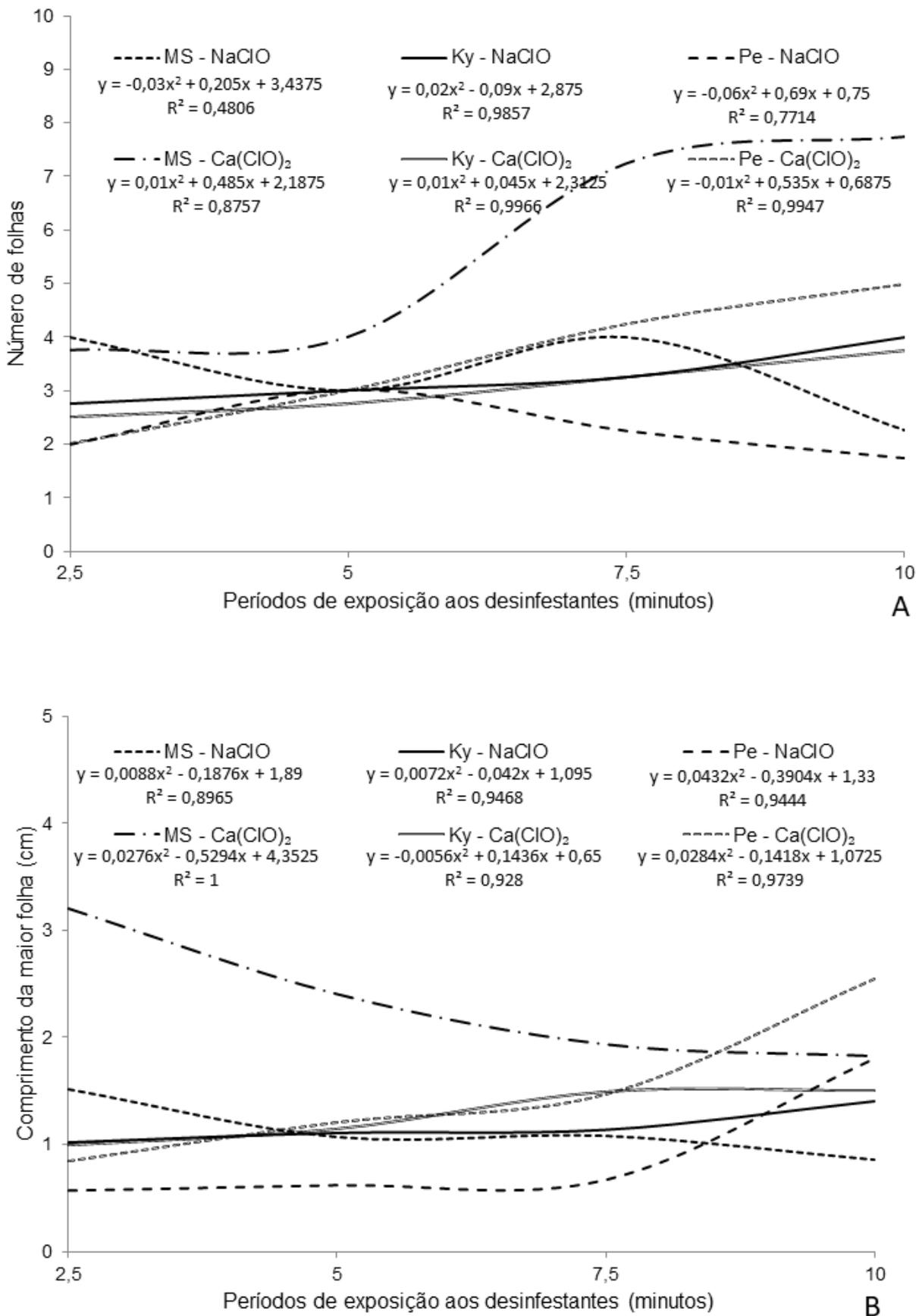


Fig. 2. Número de Folhas (NF) e Comprimento da Maior Folha (CMR), avaliadas após 180 dias de cultivo *in vitro*, com relação a meios de cultivo e períodos de exposição a diferentes concentrações de NaClO e $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ em sementes de *Epidendrum secundum*. MS = Meio de Murashige & Skoog (1962), Ky = Meio Kyoto de Kano (1965), Pe = Meio a base de fertilizante Peters®.

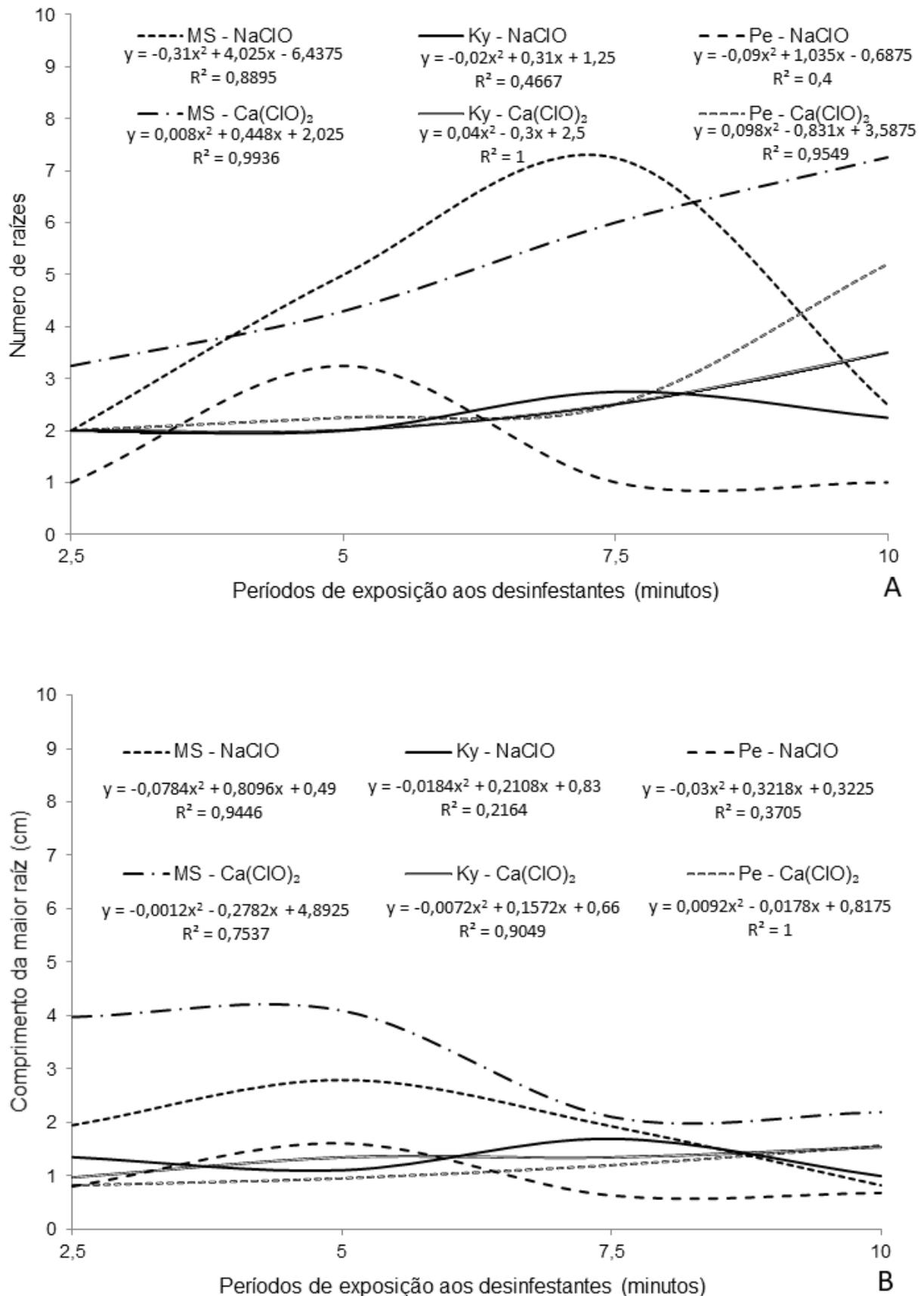


Fig. 3. Número de Raízes (NR) e Comprimento da Maior Raiz (CMR), avaliadas após 180 dias de cultivo *in vitro*, com relação a meios de cultivo e períodos de exposição à diferentes concentrações de NaClO e Ca(ClO)₂, em sementes de *Epidendrum secundum*. MS = Meio de Murashige & Skoog (1962), Ky = Meio Kyoto de Kano (1965) e Pe = Meio à base de fertilizante Peters®.

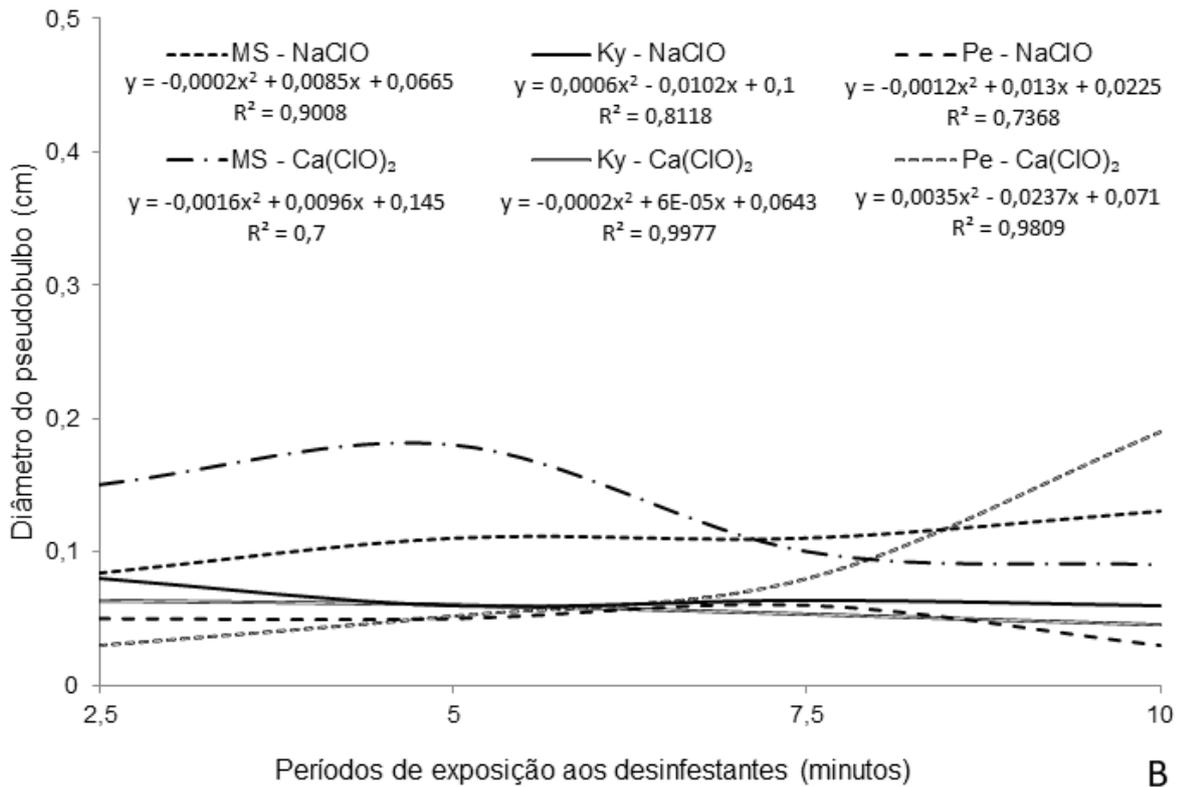
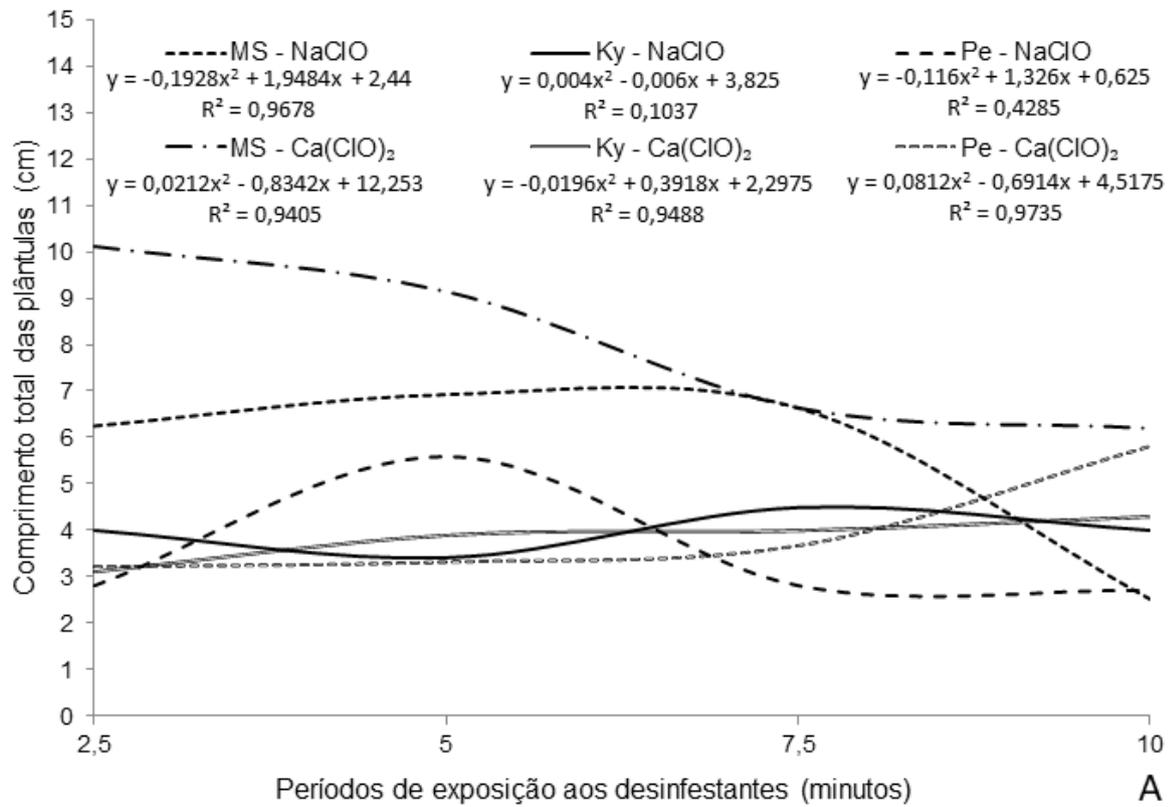


Fig. 4. Comprimento Total da Plântula (CTP) e Diâmetro do Pseudobulbo (DP), avaliadas após 180 dias de cultivo *in vitro*, com relação a meios de cultivo e períodos de exposição a diferentes concentrações de NaClO e $Ca(ClO)_2$, em sementes de *Epidendrum secundum*. MS = Meio de Murashige & Skoog (1962), Ky = Meio Kyoto de Kano (1965), Pe = Meio à base de fertilizante Peters®.

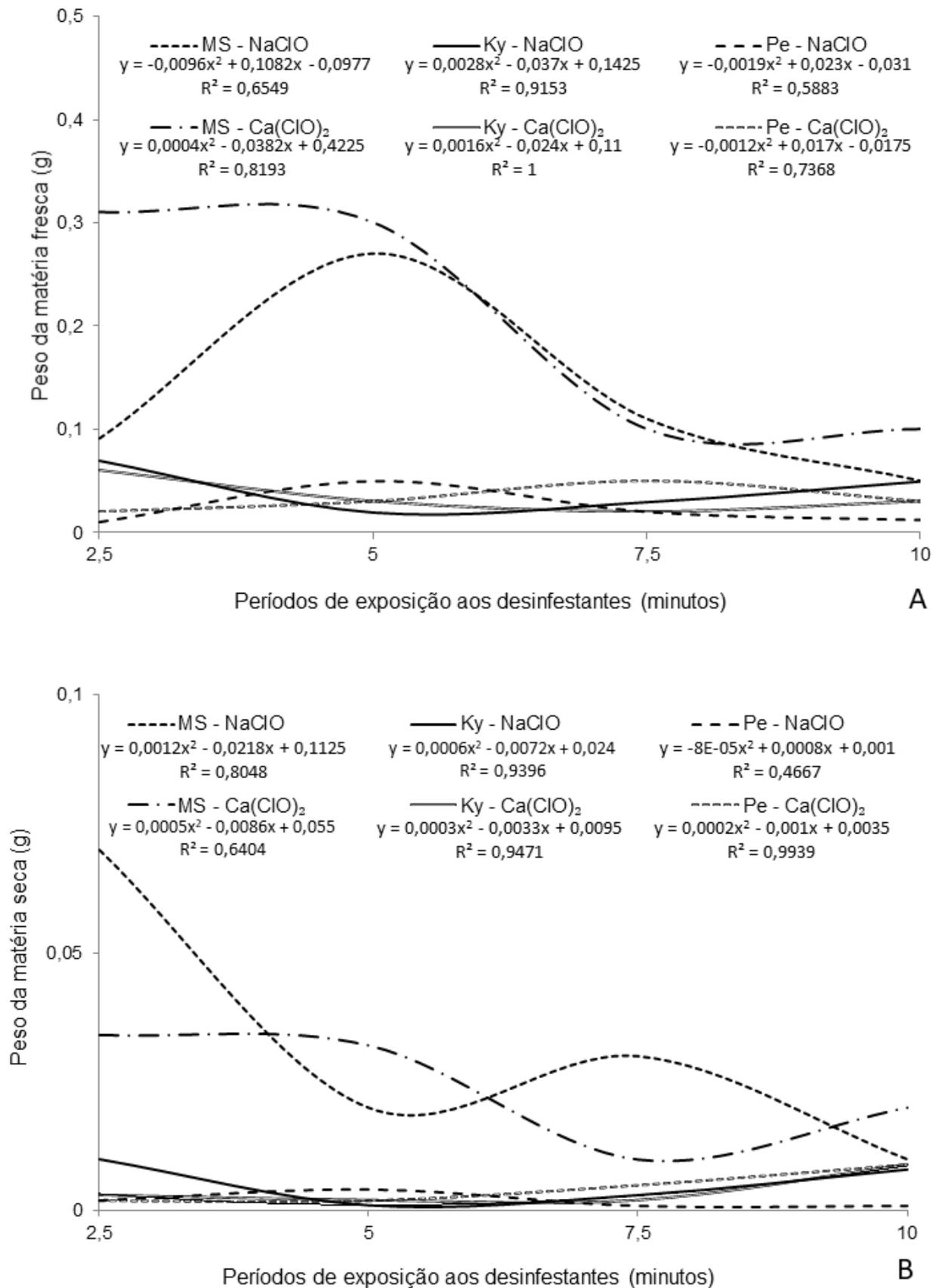


Fig. 5. Peso da Matéria Fresca (PMF) e Peso da Matéria Seca (PMS), avaliadas após 180 dias de cultivo *in vitro*, com relação a meios de cultivo e períodos de exposição a diferentes concentrações de NaClO e Ca(ClO)₂ em sementes de *Epidendrum secundum*. MS = Meio de Murashige & Skoog (1962), Ky = Meio Kyoto de Kano (1965), Pe = Meio a base de fertilizante Peters®.

Ainda, ressalta-se, que a contaminação dos meios, neste trabalho, se deu apenas por fungos. Uma das causas desse tipo de contaminação está relacionada a cuidados no ambiente de trabalho (Sousa *et al.* 2007) e erros na manipulação dos meios de cultivo por parte de funcionários (Pedroso-de-Moraes 2000), sendo que, mesmo com toda a assepsia necessária sendo realizada, em biofábricas brasileiras já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30% (Oliveira *et al.* 2000). Contudo, o desejável para produção comercial rentável de orquídeas é da ordem de 5% (Pedroso-de-Moraes 2000).

Variáveis avaliadas

Trabalhos apontam que não existe um meio de cultivo específico para espécies de orquídeas e que a concentração de sais, tanto pela falta quanto pelo excesso, pode influenciar no desenvolvimento de plântulas *in vitro* (Park *et al.* 2004, Figueiredo *et al.* 2007, Stancato *et al.* 2008). As interações entre os nutrientes modulam o crescimento das plantas (Marschner 1995), entretanto, o motivo pelos quais diferentes combinações de nutrientes e condições do meio cultivo podem fracassar ou serem um sucesso são de difícil compreensão (Ventura *et al.* 2002). Dessa forma, podem existir amplas diferenças entre as variáveis analisadas em um mesmo, ou diferentes meios de cultivo utilizados (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b). Com relação aos resultados obtidos, para as variáveis G%, IVG e DP, o meio de cultivo a base do fertilizante Peters®, mostrou-se o mais significativo estatisticamente. Contudo, para as demais variáveis analisadas, o meio MS ½ macronutrientes, apresentou-se mais efetivo em detrimentos aos: Kyoto e o base do fertilizante Peters®.

Com relação ao uso do fertilizante Peters® para composição de meios de cultivo, observou-se que concentrações entre 0,25 e 2,25 g L⁻¹ (Rodrigues *et al.* 2012a) não permitiram a definição da melhor dose a ser adicionada à meios nutritivos. Entretanto, concentrações a partir de 2 a 6 g L⁻¹ podem gerar efeitos benéficos para diversas variáveis analisadas (Rodrigues *et al.* 2012b).

A análise pormenorizada dos testes de germinação indica baixa taxa de G% para todos os períodos de desinfestação nos diferentes meios de cultivo analisados (6-32%). Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho, discordam dos observados para nove espécies de *Cattleya* Lindl., para as quais a germinação (considerada na fase de protocórmio) em meio de cultivo Knudson C, com sementes desinfestadas por 10 minutos em solução de Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) a 5%, contendo 100 µL de Tween 80, evidenciaram altas taxas de germinação, sendo a menor porcentagem encontrada para *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker (68%) e as maiores para *C. granulosa* Lindl., *C. hegeriana* (Campacci) Van den Berg, *C. intermedia* Graham ex Hook. e *C. tigrina* Verschaff. ex Lem. (99%), após 35 dias de cultivo *in vitro* (Hosomi *et al.* 2012). Da mesma forma para *Epidendrum fulgens* Brongn., foi obtida porcentagem de germinação de 83%,

quando cultivada em meio Knudson C, com sementes desinfestadas com gás formol por uma hora (Alvarez-Pardo *et al.* 2001), também sendo considerado como germinadas sementes na fase de protocórmios.

O IVG é um indicador do vigor da semente e, alterações em seus valores (sendo acréscimos ou decréscimos) têm repercussões biológicas. Decréscimos em tal índice são os primeiros indicativos do processo de deterioramento ou indução de dormência em sementes e, portanto, prejudiciais a todo o processo germinativo (Machado-Neto & Custódio 2005).

Para orquídeas, sabe-se que espécies pertencentes à subtribo Laellinae, geralmente, apresentam rápida germinação, como espécies de *Cattleya*. Entretanto, alguns representantes da subtribo apresentam maior tempo para levar a cabo sua germinação, como por exemplo, *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., a qual germina 100 dias após sua semeadura (Ávila-Diaz *et al.* 2009). Também, gêneros de orquídeas como *Paphiopedilum* Pfitzer, apresentam períodos germinativos semelhantes (Long *et al.* 2010). Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram baixo IVG em relação aos obtidos para espécies de *Cattleya*, para as quais, o menor índice observado foi de 4,01 ± 0,27 para *C. tenuis* Campacci & Vedovello e o maior para *C. hegeriana* (13, 21 ± 0,09), sendo considerado como germinação o aparecimento de protocórmios (Hosomi *et al.* 2012).

As baixas taxas de G% e IVG obtidas podem ter sido ocasionadas pela autofecundação para a obtenção de sementes neste trabalho e exposição a elevadas concentrações de agentes desinfestantes de sementes.

O fenômeno da autofecundação e da endogamia culminam no declínio no número de heterozigotos com a perda ou fixação de alelos, o que pode ter influência na manutenção da diversidade genética, queda na produtividade, viabilidade de sementes, fertilidade e vigor das plantas (Crow & Kimura 1970, Allard 1971, Mettler & Gregg 1973, Geburek 1986, Falconer & Mackay 1996, Kageyama *et al.* 1998, Sebbenn *et al.* 2000), mesmo com tal prática, sendo comum para a obtenção de sementes em vários trabalhos realizados com orquídeas (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a, 2009b, Cordeiro *et al.* 2011, Cunha *et al.* 2011, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2012, Dezan *et al.* 2012, Massaro *et al.* 2012, Pedroso-de-Moraes *et al.* 2012).

Com relação à concentração de agentes desinfestantes, o hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, sendo que a concentração de tais agentes e, o tempo de exposição das sementes a estes compostos pode variar de acordo com a espécie, pois cada tecido seminal possui um nível de sensibilidade diferente, sendo necessária, então, a sua adequação de acordo com o tecido a ser desinfestado (Montarroyos 2000). Dessa forma, o uso de hipocloritos pode influenciar diretamente nas taxas de germinação *in vitro* (McCollum & Linn 1955). A ação prolongada do hipoclorito de sódio ou sua utilização em altas concentrações pode induzir deterioramento com prejuízos à G% e ao IVG (Ferreira & Ranal 1999) e até mesmo,

a dormência de sementes em algumas espécies vegetais (McCollum & Linn 1955, Hsiao 1979, Hsiao *et al.* 1981). Contudo, o hipoclorito de cálcio tem sido relatado como o agente desinfestante que apresenta o menor efeito tóxico a tecidos em comparação ao hipoclorito de sódio, permitindo correta morfogênese de plântulas, principalmente, de caules (Torres *et al.* 1998, Ferreira & Ranal 1999).

O resultado obtido para a variável DP é corroborado pelo bom desenvolvimento dos pseudobulbos durante a fase de aclimatização de plântulas realizada para *Dendrobium nobile* Lindl. cv. UEL 8, submetida a adubação com 3 g L⁻¹ da fórmula 10-30-20 (Peters®) (Faria *et al.* 2013). Entretanto, ressalta-se que para muitas orquídeas, uma das grandes limitações do fertilizante Peters® diz respeito à ausência de Ca em suas formulações, cujo uso, frequentemente, gera morte de gemas e brotações jovens, sintoma clássico da deficiência deste elemento (Rodrigues *et al.* 2002).

Os melhores resultados encontrados para as variáveis CMF, CMR, CTP, NF, NR, PMF e PMS foram observados para o meio de cultivo MS ½ macronutrientes, corroborando com os obtidos para as Laellinae: *Cattleya cinnabarina* van den Berg (Stancato & Faria 1996), *Schomburgkia gloriosa* Rchb. f. (Dezan *et al.* 2012) e *E. secundum* Jacq. (Massaro *et al.* 2012).

Ainda, a avaliação de diferentes meios de cultura: MS (Murashige & Skoog 1962), KC (Knudson 1946), RL (Rosa & Laneri 1977) e VW (Vacin & Went 1949), para germinação e desenvolvimento de plântulas de *Cymbidium aloifolium* Lindl., *Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxton e *Epidendrum radicans* Lindl., revelaram que os meios nutritivos MS e RL, respectivamente, obtiveram os melhores resultados para desenvolvimento vegetativo para as espécies estudadas (Reddy *et al.* 1992).

Em concordância com os resultados obtidos, temos que a utilização de meio de cultivo MS ½ macronutrientes gerou bons resultados para as variáveis CTP, PMF e PMS, quando comparados com meios à base de fertilizantes NPK para *C. fimbriatum* Rich. ex Kunth. (Rego-Oliveira & Faria 2005).

O desenvolvimento do sistema radicial é favorecido pelas taxas de amônio no meio de cultivo, sendo verificado em espécies da família Bromeliaceae como *Pitcairnia flammea* Lindl. e *Vriesea philippocoburgii* Wawra. (Mercier & Kerbauy 1991), além de espécies de Orchidaceae como *Cattleya nobilior* Rchb.f. (Araujo *et al.* 2005), o que entra em concordância com os resultados obtidos nesse trabalho para a variável CMR (Figura 2), visto que o meio MS, em comparação a outros tipos de meio de cultivo, possui altas concentrações de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (Rodríguez *et al.* 2005), sendo que, N é essencial para o controle do crescimento de plantas e sua falta pode limitá-lo (Boddey *et al.* 1997, Vaast *et al.* 1998, Perin *et al.* 2004). Dessa forma, o meio MS mostra-se bem-sucedido no cultivo *in vitro* de orquídeas, mesmo que originalmente tenha sido empregado no cultivo de tecidos de tabaco (Rodríguez *et al.* 2005).

Em relação ao fósforo e potássio, a incorporação destes pelas plantas é proporcional ao crescimento e desenvolvimento de culturas, sendo assim, no meio MS ½ macronutrientes, a concentração de sais fosfatados e sais contendo potássio permitem um incremento nas variáveis avaliadas, em especial às relacionadas ao sistema radicial (Massaro *et al.* 2012).

Em um trabalho realizado com cultivo *in vitro* de *Cattleya lodigesii* Lindl., a combinação de KCl e K₂SO₄ promoveu bom crescimento das plântulas, porém não foi favorável a variável CMR. Em contrapartida, na ausência de K₂SO₄ a variável CMR apresentou melhores resultados (Figueiredo *et al.* 2008). Isso se deve ao fato de que a absorção de um nutriente pode sofrer influência quando na presença de outro nutriente (Malavolta *et al.* 1997), tornando imprescindível a formulação de meios de cultivo específicos para cada espécie, visando uma melhoria no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas (Rego-Oliveira & Faria 2005). Mediante o exposto, pode-se concluir que o meio MS ½ macronutrientes juntamente com Ca(ClO)₂ como substância desinfestante de sementes, nos períodos de exposição de 5 e 10 min., foi a combinação mais eficaz entre os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology, Academic Press, University of Florida, Flórida. 635 p.
- Allard, R. W. 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas. Edgard Blucher, São Paulo. 381 p.
- Alvarez-Pardo, V., Souza, F. L. & Ferreira, A. G. 2001. Desinfestação de sementes de orquídeas. In Anais do Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, Ilhéus. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal. CD-ROM.
- Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G. & Nunes, V. F. 2006. Métodos de desinfestação de sementes para o cultivo *in vitro* de orquídeas epífitas do Sul do Brasil. Horticultura Brasileira 24:2.
- Araujo, A. G., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., Rodrigues, V. A., & Ferreira, A. L. 2005. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. Horticultura Brasileira 2:612-615.
- Arditti, J. & Ernest, R. 1992. Micropropagation of orchids. John Wiley & Sons, New York. 682 p.
- Atwood, J. T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. Selbyana 9:171-186.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C. & Salgado-Garciglia, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99:335-343.
- Boddey, R. M., Alves, B. J. R. & Urquiaga, S. 1994. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ¹⁵N. In Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola (M. Hungria & R. S. Araújo - ed.). Brasília: Embrapa-CNPAP, p.471-494.
- Caiafa, A. N. & Silva, A. F. 2005. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais - Brasil. Rodriguésia 56:163-173.
- Chen, L. R.; Chen, J. T. & Chang, W. C. 2002. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38:441-445.
- Chiapim, C. & Moraes, P. C. *et al.* 2012. Crescimento *in vitro* em diferentes meios de cultura: avaliação do híbrido *Brassavola perrinii* Lindl. x *Cattleya lodigesii* Lindl. Orquidário 26:57-62.
- Cordeiro, G. M., Pedroso-de-Moraes, C., Massaro, R. & Cunha, T. 2011. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meios de cultura. Revista Científica Eletrônica de Agronomia 18:22-28.

- Crow, J. F. & Kimura, M. A. 1970. An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York. 591 p.
- Cunha, T., Cordeiro, G. M., Massaro, R., Dezan, L. F. & Pedroso-de-Moraes, C. 2011. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe utilizando meios de cultivo simplificados. *Scientia Plena* 7:1-5.
- Dezan, L. F., Canassa, F., Souza-Leal, T., Diogo, J. A., Massaro, R., Cordeiro, G. M. & Pedroso-de-Moraes, C. 2012. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. *Idesia (Arica)*. 30:12-19.
- Dodson, C. H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orchid Society Bulletin* 31:525-735.
- Dodson, C. H. & Frymire, G. P. 1961. Preliminary studies in the genus *Stanhopea*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 48:137-172.
- Faiad, M. G. R. Salomão, A. N., Cunha, R. & Padilha, L. S. 1997. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet. *Revista Brasileira de Sementes*, 9:4-17.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. 1996. Introduction to quantitative genetics. Longman, London. 464 p.
- Faria, R. T., Santiago, D. C., Saridakis, D. P., Albino, U. B. & Araújo, R. 2002. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2:489-492.
- Faria, R. T., Takahashi, L. S., Lone, A. B., de Souza, G. R., da Silva, G. L. & Hoshino, R. T. 2013. UEL 8: nova cultivar de *Dendrobium*. *Horticultura Brasileira* 31:509-511.
- Fernandes, M. R., Barboza, M. P., de Souza-Leal, T., & Pedroso-de-Moraes, C. 2012. Morfobiometria carpo seminal e germinação de *Lafoesia pacari* A. St. Hil. (Lythraceae) exposta a diferentes concentrações de GA₃. *Semina: Ciências Agrárias*, 33:2571-2584.
- Ferreira, W. R. & Ranal, M. A. 1999. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. var. *parachinensis* (Bailey) *Sinskaja* (couve-da-malásia). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:353-361.
- Figueiredo, M. A., dos Santos, F. M., de Oliveira Costa, J., Costa, F. H. S. & Pasqual, M. 2007. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. *Revista Brasileira de Biotecnologia* 5:294-296.
- Figueiredo, M. A., de Araújo, A. G., Santos, K. P. J. F. C. & Rodrigues, V. A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciência Rural* 38:255-257.
- Geburek, T. 1986. Some results of inbreeding depression in Serbian spruce (*Picea omorica* (Panc.) Purk.). *Silvae genetic* 35:169-172.
- Gollo, A. L., da Silva, A. L. L., de Lima, K. K. D., Costa, J. D. L., Camara, M. C., Biasi, L. A. & Soccol, C. R. 2016. Developing a plant culture medium composed of vinasse originating from *Haematococcus pluvialis* culture. *Pakistan Journal of Botany* 48:295-303.
- Hartmann, H. T. & Kester, D. E. 1978. Propagación de planta: principios y prácticas. Continental S.A., Buenos Aires. 810 p.
- Hosomi, S. T., Custódio, C. C., Seaton, P. T., Marks, T. R. & Machado-Neto, N. B. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48:127-136.
- Hsiao, A. I. 1979. The effect of sodium hypochlorite and gibberellic acid on seed dormancy and germination of wild oats (*Avena fatua*). *Canadian Journal of Botany* 57:1729-1734.
- Hsiao, A. I., Worsham, A. D. & Moreland, D. E. 1981. Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds. *Weed Science* 29:98-100.
- Kageyama, P. Y., Gandara, F. B. & Souza, L. D. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* 12:65-70.
- Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. *Memoirs of the Faculty of Agriculture* 20:1-68.
- Kerbaui, G. B. 1997. Clonagem de plantas *in vitro*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 1:30-33.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14:214-217.
- Labouriau, L. G. & Agudo, M. 1987. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 59:37-56.
- Long, B., Niemiera, A. X., Cheng, Z. Y. & Long, C. L. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101:151-162.
- Machado-Neto, N. B. & Custódio, C. C. 2005. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. *Selbyana* 26:229-235.
- Malavolta, E., Vitti, G. C. & Oliveira, S. A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2ed. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba, SP. 319 p.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, New York. 888 p.
- Massaro, R., Cordeiro, G. M., de Souza-Leal, T. & Pedroso-de-Moraes, C. 2012. Desenvolvimento *In Vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. Em Meios de Cultivo Simplificados. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente* 5:21-32.
- McCollum, J. P. & Linn, M. B. 1955. Bleaching and disinfecting discolored pepper seed with sodium hypochlorite. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 66:345-349.
- Mercier, H. & Kerbaui, G. B. 1991. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. *Journal of Plant Physiology* 138:195-199.
- Mettler, L. E. & Gregg, T. G. 1973. Genética de populações e evolução. Polígono/ EDUSP, São Paulo. 262 p.
- Montarroyos, A. V. V. 2000. Contaminação *in vitro*. *ABCTP Notícias* 36:5-10.
- Murashige, T. & Skoog, F. A. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Oliveira, R. P., Silveira, D. & Silva, S. 2000. Efeito da desinfestação e do uso de meios de indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 22:57-61.
- Oliveira, R. L. & Faria, R. T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum* 27:1-5.
- Pansarin, E. R. & Amaral, M. C. E. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 3:211-219.
- Park, S. W., Jeon, J. H., Kim, H. S., Park, Y. M., Aswath, C. & Joung, H. 2004. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Science Horticulturae* 99:199-205.
- Patricio, F. R. A., Borin, R. B. R. G. & Ortolani D. B. 1995. Patógenos associados a sementes que reduzem a germinação e vigor. *In* (J.O.M. Menten - ed) *Patógenos em Sementes: Detecção, Danos e Controle Químico*. p. 137-160.
- Pedroso-de-Moraes, C. 2000. Cultivo de orquídeas. *Biblioteca Duse Rüeegg Ometto, Araras*. 130 p.
- Pedroso-de-Moraes, C., Diogo, J. A., Pedro, N. P., Canabrava, R. I., de Assis Martini, G. & Marteline, M. A. 2009a. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biotecnologia* 7:67-69.
- Pedroso-de-Moraes, C., Santos, N. S., Massaro, R., Cordeiro, G. M. & Souza Leal, T. 2009b. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard. (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaios e Ciência* 13:57-65.
- Pedroso-de-Moraes, C., Souza-Leal, T. D., Panosso, A. R. & Souza, M. C. D. 2012. Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: *Vanilloideae*). *Acta Botanica Brasílica* 26:714-719.
- Perin, A., Santos, R. H. S., Urquiaga, S., Guerra, J. G. M. & Cecon, P. R. 2004. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:35-40.
- Pinheiro, F. & Barros, F. 2007. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* 25:129-136.
- Pridgeon, A. M. 2014. Introduction. *In* *Anatomy of the Monocotyledons: Orchidaceae* (W. L. Stern ed.) Oxford University Press, Oxford. p. 1-42.

- Reddy, P. V., Nanjan, K. & Shanmugavelu, K. G. 1992. *In vitro* studies in tropical orchids: seed germination and seedling growth. *Coimbatore* 6:75-78.
- Rego-Oliveira, L. V. & Faria, R. T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum Agronomy* 27:1-5.
- Rodrigues, D. T., Alvarez, V. V. H. & Novais, R. F. 2002. Crescimento de um híbrido de orquídea em resposta a fertilizantes, doses e modo de aplicação. Rio de Janeiro. CD Fertibio.
- Rodrigues, D. T., Novais, R. F., Alvarez, V. H., Dias, J. M. M., Otoni, W. C. & de Albuquerque Villani, E. M. 2012a. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. *Revista Ceres* 59:1-9.
- _____. 2012b. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. *Revista Ceres* 59:9-15.
- Rodríguez, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., Castañeira, M. A., de la Cruz, G. & González, J. 2005. Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas. Disponível em: <http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/restauracion/1_ar26.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2014.
- Rosa, M. D. & Laneri, U. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth *in vitro* of some cultivated orchids and the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *American Orchid Society Bulletin* 46:813-820.
- Sebbenn, A. M., Seoane, C. E. S., Kageyama, P. Y. & Vencovsky, R. 2000. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). *Scientia Florestalis* 58:127-143.
- Silva, A. L. L., Costa, J. D. L., Gollo, A. L., Dos Santos, J. D., Forneck, H. R., Biasi, A. L. & Soccol, C. R. 2014. Development of a vinasse culture medium for plant tissue culture. *Pakistan Journal of Botany* 46: 2195-2202.
- Sousa, G. C., Clemente, P. L., Isaac, V. L. R., Faria, S. P., de Siqueira Ferreira, A. & de Cássia Campos, M. R. 2007. Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. *Revista Brasileira de Biociências* 5:405-407.
- Stancato, G. C. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultra Ornamental* 7:25-33.
- Stancato, G. C., Abreu, M. F. & Furlani, A. M. C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. *Bragantia* 67:51-57.
- Stancato, G. C. & Faria, R. T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae): effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11:41-43.
- Torres A. C., Caldas L. S. & Buzzo J. A. 1998. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, v.1-2. Embrapa, Brasília. 864 p.
- Vaast, P., Zasoski, R. J. & Bledsoe, C. S. 1998. Effects of solution pH, temperature, nitrate/ammonium ratios and inhibitors on ammonium and nitrate uptake by Arabica coffee in short term solution culture. *Journal of Plant Nutrition* 21:1551- 1564.
- Vacin, E. & Went, F. W. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette* 110:605-613.
- Ventura, G. M., Dias, J. M. M., Teixeira, S. P., Carvalho, V. S., Motoike, S. Y., Novais, R. F. & Cecon, P. R. 2002. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. *Revista Ceres* 47:613-628.