

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO EM MEIOS
ASSIMBIÓTICOS PARA *Dendrobium nobile* Lindl. E
Dendrobium phalaenopsis Fitzg.**

JOSÉ CARLOS SORGATO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2016**

**PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO EM MEIOS
ASSIMBIÓTICOS PARA *Dendrobium nobile* Lindl. E
Dendrobium phalaenopsis Fitzg.**

JOSÉ CARLOS SORGATO
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

Tese 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 Doutor

Dourados
Mato Grosso do Sul
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S713p	<p>Sorgato, José Carlos. Protocolo de germinação em meios assimbióticos para <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. e <i>Dendrobium phalaenopsis</i> Fitzg. / José Carlos Sorgato. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 54f.</p> <p>Orientadora: Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Orchidaceae. 2. Meios de cultivo. 3. Agente desinfestante. 4. Irradiância. 5. Agente geleificante. 6. Carvão ativado. I. Título.</p> <p>CDD –635.9</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

**Protocolo de germinação em meios assimbióticos para
Dendrobium nobile Lindl. e *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.**

por

JOSÉ CARLOS SORGATO

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título
de DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em: 02/03/2016



Dr.^a. Yara Brito Chaim Jardim Rosa
UFGD/FCA



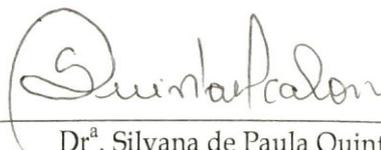
Dr.^a. Claudia Roberta Damiani
UFGD/FCBA



Dr. Edgar Jardim Rosa Junior
UFGD/FCA



Dr. Etenaldo Felipe Santiago
UEMS



Dr.^a. Silvana de Paula Quintão Scalon
UFGD/FCA

“O Senhor Deus tomou o homem e colocou-o no jardim do Éden para cultivá-lo e guardá-lo.”

Livro do Gênesis, Capítulo 2, Versículo 15.

A Deus

Aos meus pais,
José Sorgato e Margarida M. Roth Sorgato

Aos meus irmãos,
Marcos C. Sorgato, Silvio C. Sorgato e Fernanda L. Sorgato
Dedico

AGRADECIMENTOS

1. A Deus, pela vida, coragem de enfrentar as dificuldades e oportunidade de alcançar minhas conquistas.
2. A minha orientadora Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa pelos ensinamentos, exemplo, ajuda, paciência, amizade, confiança e credibilidade em mim depositada.
3. A Jackeline Schultz Soares pela ajuda, paciência e amizade.
4. A técnica de laboratório Nilda Tiyoko Kobayashi Hoffmann, por sua ajuda, excelente exemplo e dedicação.
5. A Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados pela disponibilidade da estrutura necessária para execução do projeto.
6. A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, 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.
7. A minha família pela compreensão, ajuda e apoio em mim depositado em todos os momentos.
8. A banca examinadora pelas valiosas sugestões e correções e a todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I – TEMPO DE EMBEBIÇÃO NO AGENTE DESINFESTANTE E MEIOS DE CULTURA NA SEMEADURA <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES DE <i>Dendrobium</i>	9
RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÕES	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II – LUZ E MEIOS DE CULTURA NA SEMEADURA <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES DE <i>Dendrobium</i>	24
RESUMO	24
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4. CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO III – ÁGAR, CARVÃO E MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ESPÉCIES DE <i>Dendrobium</i>	37
RESUMO	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CONCLUSÕES	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO EM MEIOS ASSIMBIÓTICOS PARA *Dendrobium nobile* Lindl. E *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.

RESUMO

As orquídeas do gênero *Dendrobium* são umas das mais produzidas e comercializadas, tanto no Brasil como no exterior. Para atender essa demanda de mercado, uma das técnicas utilizadas de cultivo *in vitro* é a germinação assimbiótica, sendo um método eficiente para a produção rápida de mudas de orquídeas, que resulta em elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais. Entretanto, os protocolos para germinação *in vitro* variam em função da espécie a ser propagada, havendo necessidade da adequação para cada uma delas. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar um protocolo para germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. e um para *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. Foram realizados três experimentos no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nos quais avaliou-se a germinação em quatro diferentes meios de cultura, utilizando métodos de desinfestação de sementes, condições de luminosidade, concentrações de ágar e de carvão ativado. De maneira geral, a germinação aos 45 dias após a sementeira, foi maior quando utilizou-se cinco minutos de desinfestação das sementes em solução de hipoclorito de sódio, seguido da prática da tríplex lavagem para os meios de cultivo assimbiótico MS e MS ½. Quando foram estudadas condições de luminosidade, observou-se que, para *D. nobile* cultivado em meio MS sob luz fluorescente branca + luz fluorescente vermelha houve a maior porcentagem de germinação, já para *D. phalaenopsis* com a utilização do mesmo meio de cultivo a luz fluorescente branca foi a que proporcionou a maior porcentagem de germinação. As sementes das duas espécies germinaram em todas as combinações de ágar e carvão ativado estudadas. Para obtenção de plântulas mais desenvolvidas recomenda-se a utilização dos meios MS e MS ½ geleificados com 4,0 a 8,0 g L⁻¹ de ágar e isentos de carvão ativado. Com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se um protocolo de germinação para *D. nobile* e um para *D. phalaenopsis*.

Palavras-chave: Orchidaceae, meios de cultivo, agente desinfestante, irradiância, agente geleificante, carvão ativado.

PROTOCOL ASYMBIOTIC MEDIA SEED GERMINATION TO *Dendrobium nobile* Lindl. and *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.

ABSTRACT

The *Dendrobium* genus of orchids are one of the most produced and marketed, both in Brazil and abroad. To meet market demand, one of the techniques used *in vitro* culture is asymbiotic seed germination an efficient method for the rapid production of orchid seedlings resulting in higher germination rates compared to the germinating under natural conditions. However, the protocols for *in vitro* germination vary according to the species to be propagated, requiring suitability for each. This work was developed with the aim to determine a protocol for *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* Lindl. and one to *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. Three experiments were conducted at the Laboratory of *in vitro* culture and Jardinocultura area of the Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) - Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), in which were evaluated the germination in four different culture media using disinfection methods seeds, light conditions, agar concentrations and activated carbon. In general, germination at 45 days after sowing, was higher when it was used five minutes of disinfection of the seeds in sodium hypochlorite solution, followed by practice of triple rinsing to asymbiotic culture media MS e MS ½. When lighting conditions were studied it was observed that *D. nobile* cultivated on MS medium under white fluorescent light + red fluorescent light was the highest percentage of germination and *D. phalaenopsis* using the same culture medium the fluorescent light white was the one that provided the highest percentage of germination. The seeds of both species germinated on all combinations of agar and charcoal studied. To obtain more developed plantlets recommended the use of media MS e MS ½ jellified with 4.0 to 8.0 g L⁻¹ agar and free of activated carbon. Based on the results obtained, it was established one germination protocol for *D. nobile* and one for *D. phalaenopsis*.

Keywords: Orchidaceae, culture media, disinfecting agent, irradiance, gelling agent, activated charcoal.

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade de produção de flores e plantas ornamentais no Brasil vem se desenvolvendo como um setor de destaque, promissor entre os segmentos da horticultura intensiva (CARVALHO et al., 2013). Dentre as flores e plantas ornamentais, as orquídeas estão entre as mais apreciadas e de grande valor comercial, devido à capacidade de combinação genética, beleza, diversidade de cor, forma e durabilidade de suas flores, além do fato de algumas espécies apresentarem propriedades medicinais e culinárias (PASQUAL et al., 2011; SUZUKI, 2014).

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das famílias das angiospermas tornava-se diferenciada (GARAY, 1972). É considerada a maior família dentre as monocotiledôneas, possuindo cerca de 850 gêneros, cerca de 35.000 espécies e mais de 120.000 híbridos, distribuídos em quase todos os continentes, com exceção dos pólos Ártico e Antártico (STOUTAMIRE, 1964; DRESSLER, 2005; KERBAUY, 2011; FARIA et al., 2012). No Brasil, Barros et al. (2016) listam 238 gêneros e 2.553 espécies, das quais 1.636 são endêmicas do país.

A comercialização mundial de orquídeas movimenta cerca de US\$ 60 bilhões anuais (MARTSYNOVSKA, 2011; SUZUKI, 2014). No Brasil, a maior parte da exploração comercial de orquídeas é realizada pela venda de mudas envasadas, juvenis ou floridas (SUZUKI, 2014). Dentre os gêneros mais comercializados, pode-se citar *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium* e *Phalaenopsis* (FARIA et al., 2012).

Os produtores brasileiros têm respondido atentamente ao crescimento contínuo deste seguimento no mercado interno, e a cada ano vêm introduzindo novos híbridos de orquídeas, resultantes de melhoramentos efetuados nos principais países produtores como Holanda, Tailândia, Japão, Estados Unidos e Equador (SUZUKI, 2014; SEBRAE, 2015). Segundo Junqueira & Peetz (2014), em 2013 no Brasil houve um aumento de cerca de 20% na importação de mudas de orquídeas em relação ao ano anterior, demonstrando o aumento do consumo dessas flores no mercado interno. A Tailândia é reconhecida no âmbito internacional pela produção de *Dendrobium*, sendo o maior país exportador desta orquídea e o Brasil é um dos seus principais importadores (LEKAWATANA, 2010).

O gênero *Dendrobium* é constituído por aproximadamente 1.500 espécies, quase todas epífitas, apresentando grande variabilidade genética e considerado um dos

maiores da família. Por sua grande quantidade de espécies e de híbridos, cultiváveis em todos os tipos de clima, larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e elevado valor florístico, é um dos gêneros mais produzido e comercializado, tanto no Brasil como no exterior (LORENZI & SOUZA, 2008; FARIA et al., 2010; SORGATO et al., 2015a). Além do aspecto ornamental e valor comercial na floricultura, estas orquídeas, em algumas partes do mundo, são utilizadas com fins medicinais, na produção de fármacos ou pela indústria de cosméticos (FARIA et al., 2010; NG et al., 2012; LV et al., 2013; LAM et al., 2015).

Dentre suas espécies, a mais cultivada é o *Dendrobium nobile* Lindl. (FARIA et al., 2010). É uma planta herbácea, epífita, perene, entouceirada, originária da China e Himalaia, muito utilizada na tradicional medicina chinesa por apresentar propriedade antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-tumoral e anti-mutagênica (LORENZI & SOUZA, 2008; LAM et al., 2015). A floração ocorre preferencialmente no fim do inverno e início da primavera, caracterizada pela presença de uma a três flores dispostas nos nós, com sépalas e pétalas brancas, róseas ou amareladas e labelo com manchas roxo-escuras ou claras na garganta (LORENZI & SOUZA, 2008) (Figura 1).



FIGURA 1. Flor de *Dendrobium nobile*. Foto: José Carlos Sorgato (2014).

Outra orquídea amplamente cultivada e comercializada é o *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. No Mato Grosso do Sul, ela produz hastes com 8 a 16 botões florais, dependendo da idade da planta, e suas flores, quando abertas, apresentam

diâmetro em torno de 5 cm, florescendo entre março e julho durante aproximadamente 30 dias (SORGATO et al., 2015b) (Figura 2).



FIGURA 2. Flor de *Dendrobium phalaenopsis*. Foto: José Carlos Sorgato (2014).

As técnicas de cultivo *in vitro* são utilizadas como instrumento para multiplicação de várias espécies vegetais, incluindo as orquídeas, sendo uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas tanto para a pesquisa e preservação das espécies, quanto para a produção em escala comercial (CARDOSO, 2014; SORGATO et al., 2014). Uma das técnicas mais utilizadas para a produção uniforme e rápida de mudas de orquídeas, que resulta em elevados percentuais de germinação é a germinação assimbiótica, considerada uma alternativa viável e relevante para produção de gêneros comercialmente importantes (ARAÚJO et al., 2006; FARIA et al., 2012; ZENG et al., 2012). Sendo de grande importância a formulação e o estabelecimento de protocolos de germinação, que garantam bons resultados.

Um dos fatores que interfere no sucesso da germinação assimbiótica é a contaminação do material vegetal por fungos e bactérias. A proliferação desses microorganismos compromete a produção de mudas, podendo causar perdas de até 10% (FARIA et al., 2012). Uma das formas de evitar isso é a desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio (CAMPOS, 2002; FARIA et al., 2012). Para tanto, emprega-se uma solução aquosa de hipoclorito de sódio, onde as sementes ficam imersas por um determinado período, de modo a controlar a contaminação.

Apesar do sucesso dessa técnica de desinfestação, algumas sementes de Orchidaceae apresentam-se mais susceptíveis ao hipoclorito de sódio, ocasionando baixa porcentagem de germinação em meio assimbiótico (CHU & MUDGE, 1994), uma

vez que esse produto pode ser tóxico, dependendo da concentração e do tempo de exposição utilizados (CHU & MUDGE, 1994; ODDIE et al., 1994).

Para o sucesso do cultivo *in vitro*, a escolha apropriada do meio nutritivo é essencial. A formulação, a consistência e o enriquecimento do meio de cultura juntamente com a composição espectral da luz e a condição de luminosidade são alguns dos principais fatores que influenciam nas respostas germinativas, que variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, podendo ser específicas nas diferentes etapas da germinação, crescimento e desenvolvimento (STEWART & KANE, 2006; TEMJENSANGBA & DEB, 2006; PAUL et al., 2012; SILVA et al., 2015a). De modo geral, os meios nutritivos MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN & WENT, 1949) são os mais utilizados na germinação assimbiótica e no cultivo *in vitro* de orquídeas (SUZUKI et al., 2010; FARIA et al., 2012; SILVA et al., 2015a; SILVA et al., 2015b).

Além da escolha do meio, sua consistência também deve ser considerada, já que a difusão dos nutrientes para a semente aumenta ou diminui em função da concentração do agente geleificante utilizado que, na maioria das vezes, é o ágar (FARIA et al., 2012). Assim como o ágar, outro componente que pode ser adicionado ao meio de cultivo é o carvão ativado, pois a ele são atribuídos efeitos benéficos na germinação de sementes de orquídeas, graças à sua capacidade de adsorção de substâncias inibidoras que são liberadas pelos tecidos vivos e pelo meio de cultura (FARIA et al., 2012; SOARES et al., 2012).

Outro fator que influencia o cultivo *in vitro* é a luz, que atua nos processos de germinação, fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. Devido a isso, alguns autores têm analisado diferentes comprimentos de onda, fotoperíodo e irradiância como forma de propiciar maior germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto ainda há pouca informação sobre o efeito da luz na germinação de orquídeas (ARDITTI & ERNST, 1984; TSUTSUMI et al., 2011; SILVA et al., 2015a; ZENG et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se determinar um protocolo para germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. e um para *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. quanto à desinfestação de sementes, condições de luminosidade, concentrações de ágar e de carvão ativado em quatro meios de cultivo assimbiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.2, p.61-67, 2006.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 177–222.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N., PESSOA, E. M.; FORSTER, W. MENINI NETO, L.; FURTADO, S. G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C. O.; GUIMARÃES, L. R. S. *Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. 2016. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>.
- CAMPOS, D. M. **Orquídea: manual prático de reprodução**. 3 ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 383-384, 2014.
- CARVALHO, A. C. P. P.; TOMBOLATO, A. F. C.; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O; SILVA, F. **Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais**. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed. Embrapa, 2013. Parte 1, Cap. 1. p. 13-53.
- CHU C.; MUDGE, K. W. Effects of pre-chilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow Lady's slippers orchid (*Cypripedium calceolus* var. *puvescens*). **Lindleyana**, v.9, p.153-159. 1994.
- DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v.26, p.155-158, 2005.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias, 2010. 208 p.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012.124p.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, v.53, p.202-215, 1972.
- IBRAFLOR. **Análise Prospectiva para o Setor Atacadista de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil e suas Tecnologias de Informação**. 2015. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=237>.

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

KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua. 2011. 383p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

LAM, Y.; NG, T. B.; YAO, R. M.; SHI, J.; XU, K.; SZE, S. C. W.; ZHANG, K. Y. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

LEKAWATANA, L. Thai Orchid: Current Situation. In: LEE, Y. I; RUNKLE, E. (ed.) **Article from 1^o Taiwan International Orchid Symposium**. Taiwan, 2010. p. 1-11.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas Ornamentais no Brasil. 4ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1088p.

LV, G. Y.; YAN, M. Q.; CHEN, S. H. Review of pharmacological activities of *Dendrobium officinale* based on traditional functions. **Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica**, v. 38, p. 489-493, 2013.

MARTSYNOVSKA, O. Global Floriculture Industry Value Chain. **Position of the Ukrainian Firms in the Floriculture Business**. Lund University, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NG, T. B.; LIU, J. Y.; WONG, J. H.; YE, X. J.; SZE, S. C. W.; TONG, Y.; ZHANG, K. Y. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, p. 1795-1803, 2012.

ODDIE, R. L. A.; DIXON, K. W.; MCCOMB, J. A. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids. **Lindleyana**, v. 9, p. 183-189, 1994.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 324-329, 2011.

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a 6 threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

SEBRAE. **Flores e plantas ornamentais do Brasil: séries estudos mercadológicos**.

2015. Disponível em:
http://www.hortica.com.br/artigos/2015/FPO_BR_Estudos_Mercadologicos_2015_Vol1.pdf.

SILVA, J. A. T.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. *Dendrobium* micropropagation: a review. **Plant cell reports**, v. 34, p. 671-704, 2015b.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015a.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 617-623, 2012.

SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Acido naftalenoacético no enraizamento *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzgerald. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 72-79, 2014.

SORGATO, J. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUZA, G. G. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v. 45, p. 231-237, 2015b.

SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; COSTA PINTO, J. V.; ROSA, Y. B. C. J. Potencial germinativo de sementes e qualidade de keikis de *Dendrobium nobile* em diferentes fases do desenvolvimento dos frutos. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1965-1971, 2015a.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006.

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

SUZUKI, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil. In: 21ª Reunião Anual do Instituto de Botânica, 2014. São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto de Botânica. 2014. p. 1-4.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, p. 731-742, 2010.

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p. 223-228, 2006.

TSUTSUMI, C.; MIYOSHI, K.; YUKAWA, T.; KATO, M. Responses of seed germination and protocorm formation to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). **Botany**, v. 89, p. 841-848, 2011.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

ZENG, S.; HUANG, W.; WU, K.; ZHANG, J.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DUAN, J. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. **Critical reviews in biotechnology**, p. 1-14, 2015.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.

CAPÍTULO I – TEMPO DE EMBEBIÇÃO NO AGENTE DESINFESTANTE E MEIOS DE CULTURA NA SEMEADURA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *Dendrobium*

RESUMO

A obtenção de mudas de orquídeas por meio da germinação assimbiótica resulta em elevados percentuais de germinação, sendo considerada uma técnica eficiente, viável e relevante do ponto de vista comercial. Apesar do sucesso dessa técnica, o tipo, a concentração e o tempo de exposição do agente desinfestante diferem, necessitando a padronização para cada espécie, pois, muitas vezes o método utilizado pode ser ineficiente ou tóxico para os embriões, reduzindo consideravelmente a porcentagem de germinação. Objetivou-se com este trabalho determinar metodologia para desinfestação de sementes a serem utilizadas na semeadura *in vitro* de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* em meios assimbióticos. Sementes dessas espécies, sob condições assépticas, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por cinco ou quinze minutos. Após esses períodos, as suspensões de sementes receberam ou não a prática da tríplice lavagem com água destilada estéril. Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo que continham quatro diferentes meios de cultura (MS, MS ½, K e VW). Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlados, onde permaneceram sob irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das espécies estudadas. Os resultados neste trabalho indicam que, independentemente do meio de cultura ou do tempo de desinfestação, as sementes quando submetidas à tríplice lavagem apresentaram porcentagem de germinação superior a àquelas que não receberam este procedimento. Recomenda-se a desinfestação das sementes por cinco minutos. Os meios MS e MS ½ foram os mais efetivos em promover a germinação *in vitro* dessas espécies.

Palavras-chave: Orchidaceae, germinação assimbiótica, hipoclorito de sódio.

IMMERSION TIME IN DISINFECTING AGENT AND CULTURE MEDIA IN *IN VITRO* SOWING OF *Dendrobium* SPECIES

ABSTRACT

The attainment of seedlings orchids through asymbiotic germination results in high percentage of germination, and is considered an effective technique, viable and relevant commercially of view. Despite the success of this technique, the type, concentration and exposure time of disinfest agent are different, requiring standardization for each species, because often the method used may be ineffective or toxic to embryos, significantly reducing the percentage of germination. The aim of this work to determine methodology for seeds sterilization to be used *in vitro* seeding *Dendrobium nobile* and *Dendrobium phalaenopsis* in asymbiotic culture media. Seeds of the species under aseptic conditions were sterilized in 0.8% sodium hypochlorite solution for five or fifteen minutes. After these periods, the seeds of suspensions received or not the practice of triple rinsing with sterile distilled water. Were then seeded into culture flasks containing four different culture media (MS, MS ½ K and VW). Later, they were transferred to a growth room with controlled temperature and photoperiod, which remained under irradiance of 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Forty-five days after sowing was evaluated the percentage of germination of the studied species. The results in this paper show that, regardless of the culture medium or the disinfestation of time, the seeds when submitted to triple rinsing showed germination percentage superior the those who did not receive this. It is recommended to seed disinfestation for five minutes. MS and MS ½ media were the most effective in promoting germination *in vitro* of these species.

Key-words: Orchidaceae, asymbiotic germination, sodium hypochlorite.

1. INTRODUÇÃO

A atividade da produção de flores e plantas ornamentais no Brasil movimentam mais de R\$ 5 bilhões por ano com taxa de crescimento anual entre 8% a 16% gerando mais de 215 mil empregos diretos (IBRAFLOR, 2015) e o cultivo de orquídeas representa uma atividade de grande importância econômica nesse setor (JUNQUEIRA & PEETZ, 2014).

Segundo Junqueira & Peetz (2014), em 2013 houve um aumento de cerca de 20% na importação de mudas de orquídeas em relação ao ano anterior. O maior exportador de *Dendrobium* é a Tailândia e o Brasil é um dos seus principais importadores (LEKAWATANA, 2010), o que demonstra o aumento do consumo dessas flores no mercado interno.

Diante da necessidade de suprir a demanda do mercado, a metodologia para produção de flores e plantas ornamentais, principalmente de orquídeas, requer maior tecnologia. (PASQUAL et al., 2008; JUNQUEIRA & PEETZ, 2014). Dentre as metodologias de produção, as técnicas de cultivo *in vitro* merecem destaque, sendo uma ferramenta biotecnológica importante na obtenção de plantas tanto para a pesquisa, quanto para a produção em escala comercial (CARDOSO, 2014).

A germinação assimbiótica de sementes de orquídeas vem sendo realizada desde o início do século passado (KNUDSON, 1922). A obtenção de mudas de orquídeas a partir desse tipo de semeadura é um processo eficiente para a produção uniforme e rápida que resulta em elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais, a qual é dependente de fungos micorrízicos, constituindo, dessa maneira, uma alternativa viável e relevante do ponto de vista comercial (FARIA et al., 2012; ABRÃO et al., 2014). Embora muito utilizada, o conhecimento disponível a respeito da composição nutricional dos meios de cultivo e dos protocolos de semeadura que favoreçam a germinação e minimizem a contaminação das culturas ainda é restrito a algumas espécies.

Os meios de cultura utilizados com maior frequência para a semeadura *in vitro* desta família botânica são KC (KNUDSON, 1946), VW (VACIN & WENT, 1949) e MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). A formulação do meio de cultura é essencial para a semente, pois fornece os constituintes necessários (minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, entre outros) para seu desenvolvimento, podendo ser

constituído por diferentes combinações, de acordo com os requerimentos de cada espécie (FARIA et al., 2012).

O sucesso da germinação assimbiótica depende da ausência de contaminação do meio de cultura. A proliferação de fungos e bactérias pode causar perdas, infestando o material vegetal ou o meio de cultura utilizado. Silva et al (2015), em sua revisão citam que os produtos mais utilizados para desinfestação de sementes do gênero *Dendrobium* no cultivo assimbiótico são: etanol (EtOH), cloreto de mercúrio (HgCl₂) e hipoclorito de sódio (NaClO). Esses mesmos autores ressaltam que o tipo, a concentração e o tempo de exposição ao agente desinfestante diferem consideravelmente e, portanto, necessitam ser padronizados para cada espécie.

Apesar da consolidação da técnica de desinfestação utilizando hipoclorito de sódio, algumas sementes da família Orchidaceae apresentam-se mais susceptíveis a esse produto, o que propicia baixa porcentagem de germinação em meio assimbiótico (CHU & MUDGE, 1994), pois o hipoclorito de sódio pode ser tóxico, dependendo da concentração e do tempo de exposição utilizados, diminuindo a taxa de germinação (CHU & MUDGE, 1994; ODDIE et al., 1994).

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho determinar metodologia para desinfestação de sementes a serem utilizadas na semeadura *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. e *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. em meios assimbióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido entre fevereiro e abril de 2014. Foram utilizados como material de estudo, frutos maduros, oriundos da polinização manual das espécies de orquídeas *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*, provenientes de matrizes com mais de oito anos, cultivadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, que propiciou radiação fotossintética média diária de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, e provido de irrigação por microaspersão.

Os frutos foram destacados das matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e levados para o laboratório de cultivo *in vitro* da FCA/UFGD, onde foram desinfestados com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, dois frutos de cada espécie foram abertos com auxílio de bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 75% UR) por 14 dias. Após a

dessecação, as sementes de cada espécie foram embaladas separadamente em papel alumínio e armazenadas, sob refrigeração (5 ± 2 °C) em frascos de polipropileno opaco providos de tampa com sílica gel¹.

Foram utilizados, como meio de cultura para germinação das sementes, os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); MS ½ (MS na metade da concentração de sais); Knudson C (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN WENT, 1949). Os meios de cultivo foram solidificados com $4,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose. O pH dos meios foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência foram distribuídos em frascos de polipropileno com tampa rosqueável e capacidade de 50 mL (altura = 5 cm; diâmetro da boca = 5 cm), sendo que cada frasco recebeu 20 mL de meio de cultivo. Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento os frascos foram transferidos para ambiente estéril.

Foi realizado o teste de tetrazólio das espécies, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2014), segundo a qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, foram colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebeu 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes foram acondicionadas em ambiente desprovido de luz, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio foram acrescidas de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Foram consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis.

Após a confirmação da viabilidade para *D. nobile* (83,7%) e para *D. phalaenopsis* (98,7%), foram pesadas quatro amostras de 5 mg de sementes de cada espécie. As amostras foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%. Duas amostras de cada espécie permaneceram imersas na solução de hipoclorito por 5 minutos (5') e duas por 15 minutos (15'). Após os períodos estabelecidos, as suspensões de sementes foram diluídas para 50 mL com água destilada estéril. Uma amostra de cada espécie e de cada tempo de desinfestação foi utilizada imediatamente para a semeadura *in vitro*. As amostras restantes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (40 mL por

¹ Metodologia de armazenamento de sementes utilizada para o gênero *Dendrobium*, pelo Laboratório de Cultivo *in vitro*/FCA por até 12 meses.

lavagem) e, após este procedimento o volume dessas suspensões foi completado para 50 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. Para a semeadura *in vitro* foi utilizado um pipetador automático inoculando-se 1000 µL da suspensão de sementes por frasco.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C; 16 h) e irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ propiciada por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20W cada. Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das espécies pesquisadas. Os propágulos contidos nos frascos foram lavados com 3 mL de água destilada estéril e acondicionados em placas de acrílico (2 x 2 x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 x 0,5 cm) e, com auxílio de microscópio estereoscópico binocular com zoom, foram contados o número de sementes não germinadas (NS) e o número de protocormos clorofilados (NPC). A porcentagem de germinação (%G) foi calculada pela seguinte expressão: $\%G = [NPC / (NS + NPC)] \times 100$. Após a contagem, os tratamentos foram fotografados com auxílio de câmera digital acoplada ao microscópio estereoscópico, utilizando o programa computacional AxionVision versão 3.1 (Zeiss®).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (dois tempos de desinfestação, dois tipos de suspensões – com ou sem tríplice lavagem – e quatro meios de cultura), com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os resultados da porcentagem de germinação foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância. As médias relativas aos tempos de desinfestação e aos tipos de suspensões foram comparadas pelo teste t de *Student* e, aquelas relativas aos meios de cultura, pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito isolado e conjunto do tempo de desinfestação, do tipo de lavagem da suspensão de sementes e dos meios de cultura utilizados sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Dendrobium nobile* ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) e *D. phalaenopsis* ($p < 0,01$) (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* Dourados – MS, UFGD, 2015.

F.V.	G.L.	Porcentagem de germinação	
		Quadrados médios	
		<i>D. nobile</i>	<i>D. phalaenopsis</i>
Tempo (T)	1	0,55**	2,82**
Suspensão (S)	1	86,04**	828,25**
Meio de cultura (MC)	3	9,28**	0,48**
T x S	1	0,94**	0,44**
T x MC	3	0,22*	0,69**
S x MC	3	5,13**	2,21**
T x S x MC	3	2,07**	0,35**
Erro	48	0,06	0,04
CV (%)		3,8	3,8
Média geral		45,3%	41,3%
Nº de sementes		250,0	150,0

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

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

De maneira geral, para as espécies utilizadas, independentemente do meio de cultura ou do tempo de desinfestação, as sementes quando submetidas à tríplice lavagem apresentaram %G superior àquelas que não receberam este procedimento, exceção observada em *D. nobile* quando semeada em meio de cultura VW e desinfestada por 5', onde não foi constatada diferença estatística entre as %G (Quadro 2).

Para *D. nobile*, o tempo de desinfestação de 5' propiciou as melhores %G, com média geral (entre os procedimentos de lavagem) de 47,1% enquanto o tempo de 15' propiciou %G média de 43,3%. Para o tempo de 5', quando as sementes receberam tríplice lavagem, houve aumento de 33,5% na germinação. As sementes submetidas à tríplice lavagem apresentaram %G média de 63,8% enquanto que as outras apresentaram %G média 30,3%. Entre os meios de cultivo, o que propiciou maiores valores de %G foi o MS ½, seguido pelo K, MS e VW. Sendo assim, o maior valor de %G foi observado em meio MS ½ quando utilizou-se o tempo de embebição em solução desinfestante de 5' e tríplice lavagem das sementes (81,2%) (Quadro 2).

Com relação ao *D. phalaenopsis*, o tempo de desinfestação de 5' propiciou as melhores %G para todos os meios de cultura e tipo de lavagem. Quando estas sementes passaram pela tríplice lavagem, houve aumento de 82,4% na germinação, proporcionando média da %G de 85,5%. Nessas condições os meios de cultivo que

propiciaram as maiores valores de %G foram o MS e o MS ½, seguidos do VW e do K. Deste modo, o maior valor de %G foi observado nos meios MS e MS ½, quando se utilizou o tempo de embebição em solução desinfestante por 5' e tríplice lavagem das sementes (95,5%) (Quadro 2).

QUADRO 2. Porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *D. phalaenopsis* em função do meio de cultura, do tipo de lavagem da suspensão (CL= com lavagem; SL= sem lavagem) e do tempo de desinfestação das sementes. Dourados – MS, UFGD, 2015.

<i>Dendrobium nobile</i>					
Lavagem	Tempo de desinfestação 5'				Média geral
	MS	MS ½	K	VW	
CL	56,8 cA ^a	81,2 aA ^a	68,1 bA ^a	49,2 dA ^a	63,8
SL	11,1 cB ^b	28,8 bB ^b	33,4 bB ^a	48,1 aA ^a	30,3
M. geral					47,1
Lavagem	Tempo de desinfestação 15'				Média geral
	MS	MS ½	K	VW	
CL	45,5 cA ^b	72,5 aA ^b	56,1 bA ^b	53,7 bA ^a	56,9
SL	17,0 bB ^a	34,4 aB ^a	36,9 aB ^a	31,2 aB ^b	29,8
M. geral					43,3
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>					
Lavagem	Tempo de embebição 5'				Média geral
	MS	MS ½	K	VW	
CL	95,5 aA ^a	91,8 aA ^a	76,8 bA ^a	77,8 bA ^a	85,5
SL	0,6 bB ^a	3,3 bB ^a	1,6 bB ^a	6,7 aB ^a	3,1
M. geral					44,1
Lavagem	Tempo de embebição 15'				Média geral
	MS	MS ½	K	VW	
CL	85,2 aA ^b	69,8 bA ^b	70,9 bA ^b	73,5 bA ^b	74,9
SL	1,5 aB ^a	0,8 aB ^a	2,2 aB ^a	3,0 aB ^a	1,9
M. geral					40,9

Letras minúsculas, na linha, comparam os meios de cultura no mesmo tempo de desinfestação (5' ou 15') e tipo de lavagem da suspensão de sementes (CL ou SL) (Tukey, 5% de probabilidade).

Letras maiúsculas, na coluna, comparam o meio de cultura no mesmo tempo de desinfestação (5' ou 15') em relação ao tipo de lavagem da suspensão de sementes (Student, 5% de probabilidade).

Letras sobrescritas, na coluna, comparam o meio de cultura no mesmo tipo de lavagem da suspensão de sementes (CL ou SL) em relação ao tempo de desinfestação (Student, 5% de probabilidade).

Os meios MS e MS ½ também proporcionaram aumento na germinação de *Dendrobium tosaense* Makino, *Cattleya loddigesii* Lindl., *Epidendrum fulgens* Brong. e *Miltonia flavescens* Lindl. (LO et al., 2004; ABRÃO et al., 2014; VOGES et al., 2014; LEMES, 2015). Entretanto, outros autores observaram que dependendo da espécie

estudada, meios como VW e K proporcionaram melhores resultados em relação à germinação, como descrito por Dutra et al. (2009) e Suzuki et al. (2010) estudando a germinação *in vitro* de *Cyrtopodium punctatum* Lindl. e *Cattleya bicolor* Lindl., respectivamente.

A escolha do meio de cultivo é extremamente importante para o sucesso da germinação de sementes de orquídeas, já que o meio mais adequado para cada espécie está ligado diretamente aos nutrientes fornecidos às plantas e a sua influência na germinação (SUZUKI et al., 2009). De acordo com Stewart (1989), as espécies de orquídeas podem ser divididas em dois grandes grupos segundo suas necessidades nutricionais básicas. Um dos grupos é composto por espécies que germinam em meios de cultura com menor concentração de nutrientes, tais como o K e o VW. Já o outro grupo é composto por espécies de orquídeas que germinam melhor em meios com maior quantidade de macronutrientes como o MS. Os resultados aqui apresentados sugerem que *D. phalaenopsis*, pertença ao segundo grupo, necessitando de meios de cultivo com amplo e maior fornecimento de nutrientes, uma vez que apresentaram as maiores taxas de germinação nos meios MS e MS ½ (Figura 1) e que *D. nobile* pertença ao primeiro grupo germinando melhor em meios de cultivo com menor concentração nutricional (Figura 1).

Além do meio de cultura, o agente desinfestante também pode influenciar a germinação *in vitro*. A redução na %G das sementes quando não foi realizada a prática da tríplice lavagem, pode estar relacionada ao hipoclorito de sódio, que segundo Chu & Mudge (1994), pode ser tóxico para germinação de sementes, dependendo da concentração e do tempo de exposição utilizados. A atuação do NaClO (alcalóide), decorre da perda de Cl⁻, ativando a oxidação de íons que captura moléculas de oxigênio, e desta forma inativando microrganismos aeróbicos e esporos de fungos que são responsáveis pela maior parte das contaminações (ALVAREZ-PARDO et al., 2006).

Outro fator que pode ter contribuído para a redução da %G é o pH, uma vez que, o pH médio do meio de cultura recomendado para germinação de sementes de orquídeas é entre 5,6 e 5,8 (FARIA et al., 2012) e a solução de hipoclorito de sódio utilizada para o semeio, quando não realizada a tríplice lavagem, apresentou pH alcalino (10,8). Provavelmente a exposição das sementes a essa solução de pH elevado, juntamente com a alta concentração salina dos meios com maiores teores nutricionais, podem ter desencadeado reações químicas que dificultaram a germinação de sementes das espécies estudadas nessas condições (Figura 1).

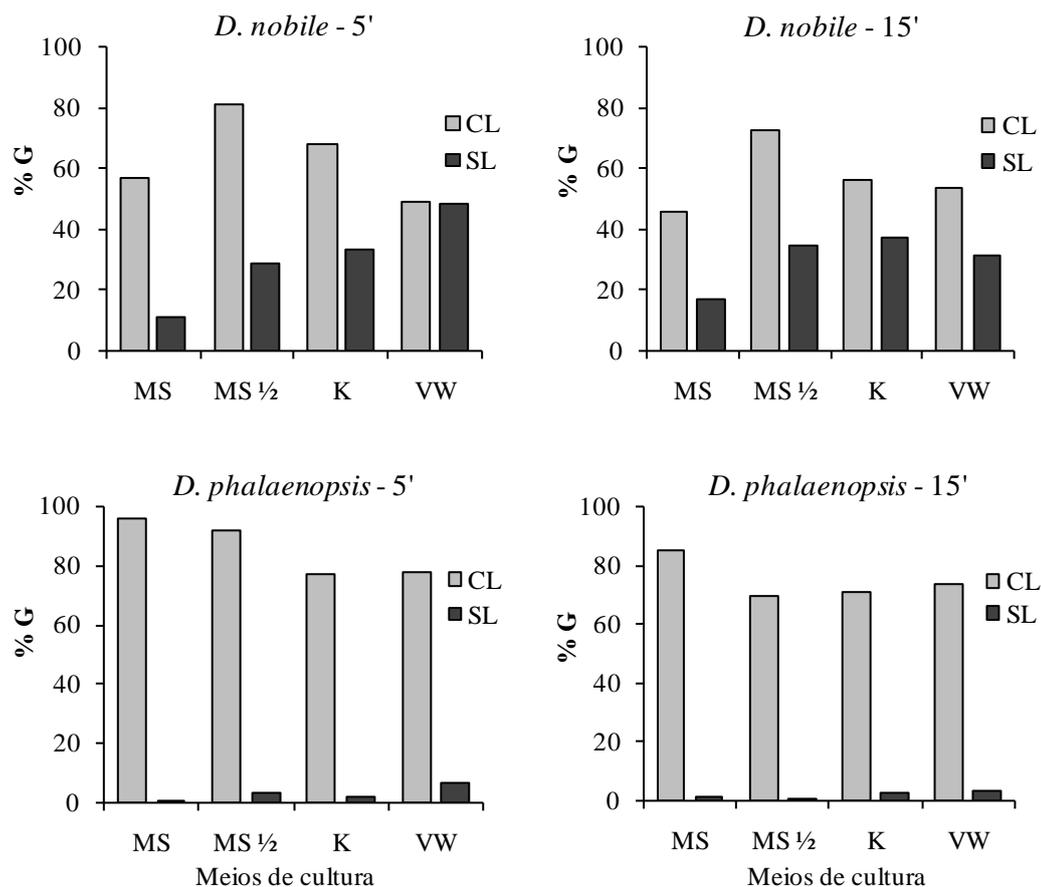


FIGURA 1. Porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* em função do meio de cultura, do tipo de lavagem da suspensão (CL= com tríplice lavagem; SL= sem tríplice lavagem) e do tempo de desinfestação das sementes. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Nos meios com maiores concentrações de valores de amônio e nitrato como o MS e MS 1/2 (Quadro 3), quando não realizada a tríplice lavagem, provavelmente ocorreu uma reação entre as moléculas de amônia e nitrato presentes, com o hipoclorito de sódio. As reações ocorridas quando o hipoclorito reage com a amônia e nitrato estão representadas nas equações 1, 2 e 3: $\text{NH}_4^+_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} \rightarrow \text{NH}_{3(\text{aq})} + \text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ (Equação 1); $\text{NaClO}_{(\text{aq})} + \text{NH}_{3(\text{aq})} \rightarrow \text{NaOH}_{(\text{aq})} + \text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (Equação 2); $2\text{NaClO}_{(\text{aq})} + 2\text{NO}_{3(\text{aq})} \rightarrow 2\text{NaNO}_{3(\text{aq})} + 2\text{ClO}^-_{(\text{aq})}$ (Equação 3).

Na primeira reação química o pH é elevado, o que desfavorece a germinação, em virtude da formação de OH^- , provenientes do hidróxido de sódio que foi produto da reação amônia-hipoclorito. Na reação nitrato-hipoclorito, o hipoclorito se decompõe na solução do meio $2\text{ClO}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- + \text{O}_2$, formando Cl^- e O_2 , que são extremamente reativas, sendo capazes de agir diretamente sobre outras moléculas presentes no meio, atuando por meio de ligações aos grupos cromóforos e também na

formação de compostos derivados com íons presentes, além de o gás oxigênio atuar na oxidação das moléculas do meio (ATKINS & JONES, 2012). Deste modo, as reações ocorridas justificam a baixa germinação nesses meios com maiores valores em amônio e nitrato, quando em contato com moléculas de hipoclorito de sódio.

No quadro 3 observa-se também que a concentração de potássio para os meios MS e MS ½ são elevadas. Considerando a liberação de Cl⁻ (terceira equação), a possibilidade de reação do potássio com esse ânion e a formação de KCl é válida. Como o potássio é um nutriente vital para o crescimento e desenvolvimento das plantas, espera-se que quanto maior a concentração de íons K⁺ ocorra maior germinação, crescimento e desenvolvimento, uma vez que o potássio está ligado diretamente na síntese de proteínas e ativação de vários sistemas enzimáticos envolvidos na respiração e fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2009).

QUADRO 3. Composição dos nutrientes dos meios de cultivo utilizados para a germinação assimbiótica de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Nutrientes	Murashige & Skoog (MS)	Murashige & Skoog (MS ½)	Knudson (K)	Vacin & Went (VW)
	mM	mM	mM	mM
Amônio (NH ₄ ⁺)	20,62	10,31	3,79	3,79
Nitrato (NO ₃ ⁻)	39,43	19,72	4,24	5,20
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	1,25	0,625	1,84	2,48
Potássio (K)	20,06	10,03	1,84	7,04
Sulfato (SO ₄ ⁻)	1,50	0,75	4,84	4,80
Cálcio (Ca ⁺⁺)	3,01	1,505	4,24	0,65
Magnésio (Mg ⁺⁺)	1,50	0,75	1,02	1,02
Cloro (Cl)	6,03	3,015	-	-
Sacarose	87,72	87,72	87,72	87,72
Nitrogênio total	60,05	30,025	8,03	8,99

Assim, ressalta-se a importância da tríplex lavagem, pois com a utilização desta prática, além do aumento na porcentagem de germinação, os propágulos apresentaram-se mais desenvolvidos aos 45 dias após a semeadura, podendo ser encontrados, segundo Suzuki et al. (2009), em estágio 2 (plântula com formação da primeira folha) e em estágio 3 (plântula com duas folhas). Quando não foi realizada a tríplex lavagem da solução de sementes, aos 45 dias após a semeadura, a grande

maioria dos propágulos encontraram-se em estágio 1 (protocormo intumescido clorofilado), alguns não clorofilados e diversas sementes não germinadas (Figura 2).

O tempo de desinfestação de sementes de orquídeas para semeadura *in vitro* varia de acordo com o tipo e a concentração do agente utilizado. Segundo Arditti & Ernst (1992), a aplicação de solução de hipoclorito de sódio de 5' a 30', permite uma desinfestação por completo das sementes, resolvendo assim o problema da contaminação. A utilização de hipoclorito de sódio a 1,25% por 15 minutos, sem o processo da tríplex lavagem, para desinfestação de sementes de *D. nobile*, foi realizada por Soares et al. (2012) e encontraram %G inferior a 50%, resultados semelhantes foram observados neste trabalho quando não realizada a prática da tríplex lavagem (Quadro 2).

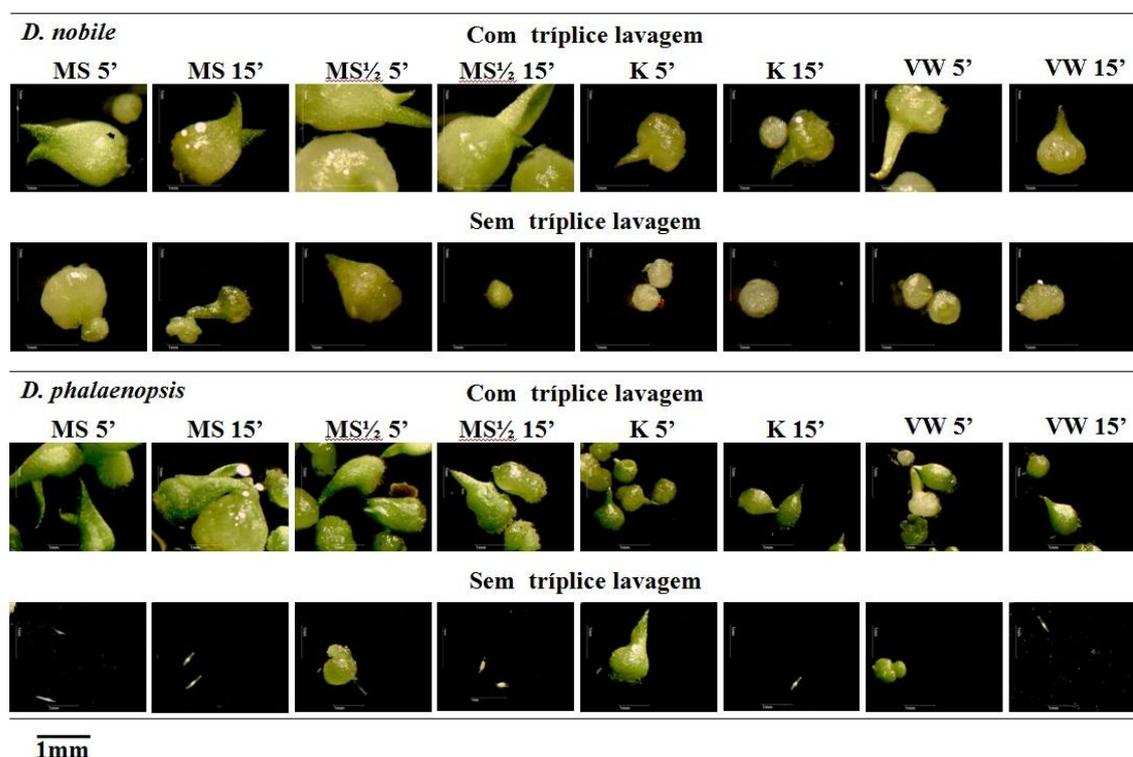


FIGURA 2. Germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* aos 45 dias após a semeadura. Dourados – MS, UFGD, 2015.

A utilização de solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 15' é recomendada por Faria et al. (2012). Entretanto, os resultados observados neste trabalho demonstram que o tempo de desinfestação de sementes *D. nobile* e *D. phalaenopsis*, para a prática da semeadura em meio de cultura assimbiótico, pode ser reduzido para 5' com a utilização de hipoclorito de sódio a 0,8%, sem a contaminação dos meios de

cultura estudados e aumentando a %G das sementes em relação ao tempo de desinfestação de 15'. Desta forma, pode-se inferir que o tempo de desinfestação de 5' foi eficiente para a desinfestação das sementes das espécies estudadas (Quadro 2).

Ainda, quando as sementes permaneceram por 5' em hipoclorito de sódio (0,8%), seguidos de três lavagens com água esterilizada, observou-se um aumento significativo da %G. Esses resultados corroboram com Alvarez-Pardo et al. (2006), que relatam a necessidade de várias lavagens com água esterilizada, após a embebição em solução de hipoclorito de sódio, para a desinfestação de sementes de orquídeas. Os autores ainda salientam que este procedimento é demorado, principalmente quando uma grande quantidade de sementes é utilizada, porém neste trabalho, a utilização de três lavagens com água destilada estéril aumentou em cerca de 34% a %G de *D. nobile* e 82% a de *D. phalaenopsis*, demonstrando que o procedimento é essencial para a semeadura *in vitro* das espécies.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados conclui-se que a utilização do tempo de desinfestação de 5', seguido da prática da tríplice lavagem e a semeadura nos meios MS e MS ½ são os mais efetivos em promover a germinação *in vitro* *D. nobile* e *D. phalaenopsis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. C. R.; JORGE, J.; PESCADOR, R.; DE MELO FERREIRA, W.; SUZUKI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl.(Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, p. 141-147, 2014.

ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed desinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**. v. 24, p. 217-220. 2006.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: Wiley-Interscience Publication. 1992. 682p.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 1048p.

CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 383-384, 2014.

CHU, C.; MUDGE, K. W. Effects of pre-chilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow Lady's slippers orchid (*Cypripedium calceolus* var. *puvescens*). **Lindleyana**, v.9, p.153-159. 1994.

DUTRA, D.; KANE, M.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 235-243, 2009.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012. 124 p.

IBRAFLOR. **Análise Prospectiva para o Setor Atacadista de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil e suas Tecnologias de Informação**. 2015. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=237>.

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

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 1-25, 1922.

LEKAWATANA, L. Thai Orchid: Current Situation. In: LEE, Y.I; RUNKLE, E. (ed.) **Article from 1º Taiwan International Orchid Symposium**. Taiwan, 2010. p. 1-11.

LEMES, C. S. R. **Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae)**. 2015. 55f. Tese (Doutorado em produção vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS.

LO, S. H.; NALAWADE, S. M.; KUO, C. L.; CHEN, C. L.; TSAY, H. S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino – a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 4ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 1088p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

ODDIE, R. L. A.; DIXON, K. W.; MCCOMB, J. A. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids. **Lindleyana**, v. 9, p. 183-189, 1994.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. D.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. D.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 45-49, 2008.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 617-623, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2275-2284, 2014.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. In: H. W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press: Cambridge, 1989. p. 147-183.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NACABASHI, M.; FERREIRA, W. M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, p. 657-666, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

VOGES, J. G.; BENEVENUTO, R. F.; FRITSCHKE, Y.; GUERRA, M. P. Protocorm development of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae) in response to different saline formulations and culture conditions. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, p. 287-292, 2014.

CAPÍTULO II – LUZ E MEIOS DE CULTURA NA SEMEADURA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *Dendrobium*

RESUMO

Para o sucesso do cultivo *in vitro*, a escolha apropriada do meio nutritivo e a condição de luminosidade são alguns dos principais fatores que influenciam nas respostas germinativas de sementes de orquídeas. Objetivou-se neste trabalho determinar as condições de luminosidade que propiciem a maior porcentagem de germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*, em meios de cultura assimióticos. Foram utilizados os meios de cultura MS, MS ½, K e VW, solidificados com 4,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose. Após a semeadura, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas ou 0 horas e temperatura controlada (25±2°C). As culturas submetidas ao fotoperíodo de 16h foram expostas às seguintes condições de luminosidade: lâmpada fluorescente branca (B) (18,9 μmol m⁻² s⁻¹); lâmpada fluorescente branca + lâmpada fluorescente vermelha (VB) (14,85 μmol m⁻² s⁻¹); lâmpada fluorescente vermelha (V) (9,45 μmol m⁻² s⁻¹). Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das espécies estudadas. A germinação das duas espécies ocorreu em todas as condições de luminosidade e em todos os meios de cultura, sendo observada a maior porcentagem de germinação na presença de luz. Sementes de *D. nobile* cultivadas em meio MS apresentaram maior porcentagem de germinação quando cultivadas sob luz VB e a maior porcentagem de germinação de *D. phalaenopsis* foi observada quando cultivadas em meio MS sob luz B.

Palavras-chave: RFA, orquídeas, germinação assimiótica.

LIGHT AND CULTURE MEDIA IN *IN VITRO* SOWING of *Dendrobium* SPECIES

ABSTRACT

For the success of *in vitro* cultivation the appropriate choice of the nutrient medium and light conditions are some of the main factors that influence the germinative answers in orchids seeds. The aim of this study was to determine the light conditions that provide the highest percentage of *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* and *Dendrobium phalaenopsis* in asymbiotic culture media. Were used MS, MS ½, K and VW culture media solidified with 4.0 g L⁻¹ of bacteriological agar and supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose. After sowing, the cultures were conditioned in growth room with photoperiod of 16 hours or 0 hours and controlled temperature (25 ± 2 °C). The cultures subjected to 16 hours of photoperiod were exposed to the following lighting conditions: white fluorescent light (B) (18.9 μmol m⁻² s⁻¹); white fluorescent light + red fluorescent light (VB) (14.85 μmol m⁻² s⁻¹); red fluorescent light (V) (9.45 μmol m⁻² s⁻¹). Forty-five days after sowing was evaluated the germination percentage of the studied species. The germination of two species occur in all light conditions and all culture media, it is observed the highest percentage of germination in the presence of light. The seeds of *D. nobile* cultivated on MS medium have a higher percentage of germination when grown under VB light and the highest germination percentage of *D. phalaenopsis* was observed when it grown on MS medium under light B.

Key-words: PAR, orchids, asymbiotic germination.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas devido ao seu grande valor comercial decorrente da beleza e exotismo de suas flores (SCHNITZER et al., 2010). Para atender a demanda do mercado consumidor assim como à pesquisa científica, a germinação assimiótica de suas sementes tem se mostrado uma técnica eficiente, pois produz um grande número de plantas em tempo reduzido quando comparado ao processo natural (KAUTH et al., 2006; KERBAUY, 2011; ZENG et al., 2012).

A escolha apropriada do meio de cultivo para a sementeira *in vitro* é um dos principais fatores para o sucesso do cultivo assimiótico, uma vez que as respostas germinativas variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, que podem ser específicas nas diferentes etapas do desenvolvimento (STEWART e KANE, 2006; PAUL et al., 2012; SILVA et al., 2015). Dentre os meios mais utilizados para a sementeira *in vitro* do gênero *Dendrobium* estão o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), VW (VACIN & WENT, 1949) e KC (KNUDSON, 1946).

Outro fator importante para a germinação assimiótica das sementes é a luz (SILVA et al., 2015). A germinação de sementes de orquídeas apresenta diferentes respostas à luz (ARDITTI & ERNST, 1984, SILVA et al., 2015). A comunidade científica aceita a hipótese de que a necessidade de luz varia de acordo com o habitat de cada espécie em condições naturais. De acordo com esse fato, as orquídeas epífitas necessitam de luz e as espécies terrícolas do escuro para a germinação, embora essas respostas sejam muitas vezes determinadas pela espécie, independentemente do seu hábito de crescimento (KAUTH et al., 2008). Alguns autores relatam que a germinação de sementes de várias espécies de orquídeas terrícolas foi inibida pela presença de luz (STOUTAMIRE, 1974; STEWART & KANE, 2006; GODO et al., 2010). Assim, a condição de escuro contínuo é comumente utilizada para a germinação simbiótica e assimiótica das sementes de orquídeas terrícolas (KITSAKI et al., 2004; YAMAZAKI & MIYOSHI, 2006; LEE et al., 2007). Entretanto nas espécies epífitas, diversos autores ainda observaram que, em condições *in vitro*, as sementes de algumas espécies germinaram tanto na presença como na ausência de luz (ARDITTI & ERNST, 1984; DUTRA et al., 2009; TSUTSUMI et al., 2011).

Além do fotoperíodo, algumas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de analisar diferentes comprimentos de onda como forma de propiciar

maior germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. Contudo poucos são os estudos relatando os efeitos morfofisiológicos que as diferentes condições de luminosidade tem sobre as orquídeas.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho determinar as condições de luminosidade que propiciem a maior porcentagem de germinação *in vitro* das orquídeas epífitas *Dendrobium nobile* Lindl. e *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. em meios de cultura assimbióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido entre maio e junho de 2014. Foram utilizados como material de estudo, frutos maduros, oriundos da polinização manual das espécies de orquídeas *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*, provenientes de matrizes com mais de oito anos, cultivadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando radiação fotossintética média diária de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, e provido de irrigação por microaspersão.

Os frutos foram destacados das matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e levados para o laboratório de cultivo *in vitro* da FCA/UFGD, onde foram desinfestados com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, dois frutos de cada espécie foram abertos com auxílio de bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes de cada espécie foram embaladas separadamente em papel alumínio e armazenadas, sob refrigeração ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) em frascos de polipropileno opaco providos de tampa com sílica gel¹.

Foram utilizados, como meio de cultura para germinação das sementes, os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); MS ½ (MS na metade da concentração de sais); Knudson C (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN WENT, 1949). Os meios de cultivo foram solidificados com $4,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose. O pH dos meios foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência foram distribuídos em frascos de polipropileno com tampa rosqueável e capacidade de 50 mL (altura= 5 cm; diâmetro da boca= 5 cm), sendo que cada frasco recebeu 20 mL de meio de cultivo.

¹ Metodologia de armazenamento de sementes utilizada para o gênero *Dendrobium*, pelo Laboratório de Cultivo *in vitro*/FCA por até 12 meses.

Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento os frascos foram transferidos para ambiente estéril.

Foi realizado o teste de tetrazólio das espécies, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2014). Comprovada a viabilidade das sementes, foi pesada uma amostra de 10 mg de sementes de cada espécie. As amostras foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 30 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%. As amostras permaneceram imersas na solução de hipoclorito por cinco minutos (5')². Após este período, as suspensões de sementes foram diluídas para 100 mL com água destilada estéril e em seguida receberam tríplice lavagem com água destilada estéril³ (80 mL por lavagem) e, após este procedimento o volume dessas suspensões foi completado para 100 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1000 µL da suspensão de sementes por frasco contendo em média 141,0 sementes de *D. nobile* e 115,0 sementes de *D. phalaenopsis*.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 (presença de luz) ou 0 horas (condição de escuro contínuo $E = 0,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). As culturas submetidas ao fotoperíodo de 16h foram expostas às seguintes condições de luminosidade: B - lâmpada fluorescente branca ($18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W cada); VB - lâmpada fluorescente branca + lâmpada fluorescente vermelha ($14,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - irradiância fornecida por uma lâmpada fluorescente branca de 40 W e uma lâmpada fluorescente vermelha de 30 W Gro-lux®); V- lâmpada fluorescente vermelha ($9,45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - irradiância produzida duas lâmpadas fluorescentes vermelhas de 30 W Gro-lux®).

Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das espécies pesquisadas. Os propágulos contidos nos frascos foram lavados com 3 mL de água destilada estéril e acondicionados em placas de acrílico (2 x 2 x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 x 0,5 cm) e, com auxílio de microscópio estereoscópico binocular com zoom, foram contados o número de sementes não germinadas (NS) e o número de protocormos clorofilados (NPC). A porcentagem de germinação (%G) foi calculada pela seguinte expressão: $\%G = [NPC / (NS + NPC)] \times 100$. Após a contagem, os tratamentos foram fotografados com auxílio de câmera digital acoplada ao

² O tempo de desinfestação das sementes foi determinado em função dos resultados observados no Capítulo 1 deste Protocolo.

³ A tríplice lavagem das sementes com água destilada estéril foi utilizada em função dos resultados observados no Capítulo 1 deste Protocolo.

microscópico estereoscópico, utilizando o programa computacional AxionVision versão 3.1 (Zeiss®).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela subdividida, sendo alocadas na parcela as quatro condições de luminosidade e na sub-parcela os quatro meios de cultura, com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os resultados da porcentagem de germinação foram transformados para $\sqrt{(x + 1)}$ e, a seguir, foram submetidos à análise de variância sendo comparados pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito isolado e conjunto da luminosidade e dos meios de cultura sobre a porcentagem de germinação (%G) de *Dendrobium nobile* e *D. phalaenopsis* (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* Dourados – MS, UFGD, 2015.

F.V.	G.L.	Porcentagem de germinação	
		Quadrados médios	
		<i>D. nobile</i>	<i>D. phalaenopsis</i>
Luz (L)	3	11,03**	0,73**
Erro a	12	0,57	0,01
Meio de cultura (MC)	3	9,94**	2,92**
L x MC	9	1,16**	0,15**
Erro b	36	0,16	0,01
CV (%)		5,7	1,5
Média geral		50,6%	82,7%

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

A germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *D. phalaenopsis* ocorreu em todas as condições de luminosidade e em todos os meios de cultura, apresentando média geral de %G de 50,6% e 82,7%, respectivamente (Quadros 1 e 2), podendo ser consideradas fotoblásticas neutras (TAIZ & ZEIGER, 2009). Esses resultados podem ser atribuídos, ao fato das orquídeas epífitas serem capazes de explorar ambientes com falta de luminosidade, escassez de água e minerais, o que pode

explicar a germinação das sementes de *D. nobile* e *D. phalaenopsis* na ausência de luz (BENZING et al., 1982).

As necessidades luminosas para a germinação de diversas espécies de orquídeas epífitas demonstram resultados contraditórios. Alguns trabalhos relatam que a germinação de espécies de orquídeas como *Odontoglossum gloriosum* (PEDROZAMANRIQUE & MICAN-GUTIÉRREZ, 2006), *Cyrtopodium punctatum* (DUTRA et al., 2009), *Ansellia africana* (VASUDEVAN & VAN STADEN, 2010) e *Liparis fujisanensis* (TSUTSUMI et al., 2011) foi satisfatória, independentemente das condições de luz. Entretanto, Dutra et al. (2009) e Tsutsumi (2011), estudando o efeito da luz na germinação assimbiótica das orquídeas epífitas *Cyrtopodium punctatum* e *Liparis fujisanensis*, respectivamente, observaram que, independente do meio de cultivo utilizado a %G foi maior na condição de escuro contínuo.

Para as duas espécies estudadas, independentemente do meio de cultivo utilizado, as maiores porcentagens de germinação foram observadas na presença da luz (16h). A %G observada nos diferentes meios de cultivo e na presença da luz para *D. nobile* foi de 55,5 (média dos valores 57,3; 51,9 e 57,4) e de 84,3 para *D. phalaenopsis* (média dos valores 84,9; 81,6 e 86,5) valores estes 20,0 e 6,5% maiores que aqueles registrados para as espécies no escuro contínuo (0h) (35,5 e 77,8) (Quadro 2). Resultados semelhantes foram verificados por Parthibhan et al. (2012), que ao estudarem diferentes fotoperíodos na germinação de *Dendrobium aqueum* observaram que após 46 dias da semeadura, a condição de escuro contínuo apresentou redução na %G, apresentando %G média de 50,8%, enquanto que a presença de luz de 8h, 12h, 16h e 24h proporcionou %G média de 67,9; 78,5; 85,8 e 93,9% respectivamente.

Houve variação da %G das espécies nos diferentes meios de cultura, em função da condição de luminosidade estudada.

Para *D. nobile*, a %G foi igual estatisticamente em todos os meios de cultura quando as sementes foram expostas à luz B, apresentando média geral de 57,3 %. Quando expostas à luz V, VB e E, a %G foi maior nos meios MS e MS ½ (Quadro 2).

Quando as sementes de *D. phalaenopsis* foram expostas à luz branca, a maior %G foi obtida com a utilização do meio MS, estatisticamente diferente dos demais meios estudados. Nas condições de luminosidade propiciadas pela V e no escuro contínuo (E), as maiores %G foram registradas nos meios MS e MS ½ e com a utilização de luz VB as %G foram maiores com a utilização dos meios MS; MS ½ e VW (Quadro 2).

QUADRO 2. Porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* em função da luminosidade e do meio de cultura. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Porcentagem de Germinação					
<i>Dendrobium nobile</i>					
Luminosidade	MS	MS ½	K	VW	Média* ¹
B	58,5 bA	64,7 aA	53,5 aA	52,7 aA	57,3
V	59,2 bA	64,2 aA	43,3 bB	40,8 bB	51,9
VB	69,5 aA	60,3 aA	50,2 aB	49,9 aB	57,4
E	46,5 cA	54,2 bA	22,5 cB	18,8 cB	35,5
Média* ²	58,4	60,9	42,4	40,6	50,6 * ³
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>					
Luminosidade	MS	MS ½	K	VW	Média* ¹
B	94,6 aA	89,1 aB	74,6 aD	81,2 bC	84,9
V	89,4 bA	88,3 aA	74,0 aB	74,7 cB	81,6
VB	90,1 bA	89,6 aA	76,0 aB	90,3 aA	86,5
E	86,5 bA	84,7 bA	69,4 bB	70,6 dB	77,8
Média* ²	90,2	87,9	73,5	79,2	82,7 * ³

Letras minúsculas comparam médias na coluna (Tukey 5%).

Letras maiúscula comparam médias na linha (Tukey 5%).

B= luz branca; V= luz vermelha; VB= luz vermelha+ branca; E= escuro.

*¹ médias das linhas; *² médias das colunas; *³ média geral.

Sementes de *D. nobile* cultivadas em meio MS apresentaram maior %G quando cultivadas sob luz VB. Em meio MS ½ a %G foi estatisticamente igual nas condições de luz B, V e VB. Nos meios K e VW as maiores %G foram obtidas com a utilização da luz B e VB (Quadro 2).

Sementes de *D. phalaenopsis* cultivadas em meio MS apresentaram maior %G quando cultivadas sob luz B. Em meio MS ½ e K a %G foi estatisticamente igual nas condições de luz B, V e VB. No meio VW a maior %G foi obtida com a utilização da luz VB (Quadro 2).

De maneira geral, a utilização dos meios MS e MS ½ propiciaram as maiores porcentagens de germinação para as duas espécies estudadas, 58,4 e 60,9% para *D. nobile* e 90,2 e 87,9% para *D. phalaenopsis*. Em relação às condições de luminosidade as maiores %G foram registradas com a utilização de luz B e VB 57,3 e 57,4% para *D. nobile* e 84,9 e 86,5% para *D. phalaenopsis* (Quadro 2).

As plantas do gênero *Dendrobium* comportam-se diferentemente em relação à exigência nutricional para a germinação de suas espécies (SILVA et al., 2015). Enquanto algumas orquídeas germinam melhor em meios nutritivos com maiores

concentrações nutricionais, outras germinam melhor em meios mais pobres em nutrientes (STEWART, 1989).

Os dados observados neste trabalho mostram que as espécies estudadas apresentaram maior %G nos meios MS e MS ½, corroborando com Lo et al. (2004), que relataram que os meios K e VW foram menos efetivos do que os meios MS e MS ½ na germinação de *Dendrobium tosaense*.

Aos 45 dias após a semeadura, as plântulas e protocormos apresentaram-se maiores quando foram utilizados os meios MS e MS ½, porém em todos os meios foram encontrados plântulas em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 1), classificados segundo Suzuki et al. (2009) em estágio 2 (plântula com formação da primeira folha), estágio 3 (plântula com duas folhas) e estágio 4 (plântula com folhas e uma ou mais raízes). Na condição de escuro contínuo, aos 45 dias após a semeadura, foram encontrados protocormos em estágio 1 (protocormo intumescido), e foi possível observar a predominância do formato alongado dos mesmos (Figura 1).

Embora tenha ocorrido germinação na condição de escuro contínuo, com a observação visual dos protocormos pode-se notar que, os mesmos apresentavam-se esbranquiçados, uma vez que a diferenciação dos proplastídios em cloroplastos e a síntese de clorofila são dependentes de luz (TAIZ & ZEIGER, 2009), tornando a luz essencial para as fases iniciais de crescimento e desenvolvimento das espécies em estudo.

Ao observar as plântulas (Figura 1) pode-se verificar que a utilização de luz vermelha é importante para o crescimento e desenvolvimentos das espécies estudadas, uma vez que a utilização do comprimento de onda vermelho promoveu o desenvolvimento das plântulas, apresentando estágio avançado 3 e 4. A luz vermelha é relatada na literatura como sendo importante no alongamento de brotos e caules, em promover respostas do fitocromo na fotomorfogênese e nas alterações na anatomia vegetal (SHIN et al., 2008; TAIZ & ZEIGER, 2009).

A análise destes resultados permite inferir que os estudos sobre a germinação das orquídeas são importantes, uma vez que, por meio deles é possível conhecer não somente a espécie, como também a sua interação com o meio no qual será cultivada, considerando que não existe um padrão de comportamento para essa família botânica na literatura científica. Novas pesquisas são necessárias para elucidação da influência da luz principalmente, em termos de qualidade e quantidade, em cada fase do

desenvolvimento das orquídeas, para o conhecimento e estabelecimento de novos protocolos.

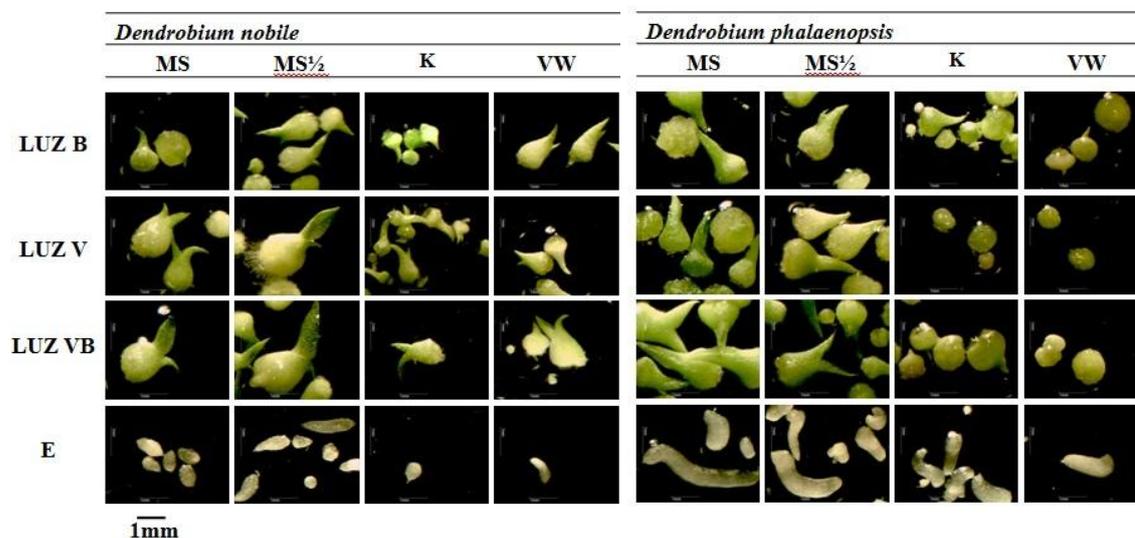


FIGURA 1. Sementes, protocormos e plântulas de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* aos 45 dias, em diferentes meios de cultura e condições de luminosidade. Dourados – MS, UFGD, 2015.

4. CONCLUSÕES

Embora a luz e a composição nutricional dos meios de cultura estudados não sejam limitantes na germinação *in vitro* de *D. nobile* e *D. phalaenopsis* a germinação das duas espécies é maior na presença da luz (B e VB) e nos meios de cultura MS e MS $\frac{1}{2}$.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 177–222.

BENZING, D. H.; OTT, D. W.; FRIEDMAN, W. E. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal of Botany**. v.69, p. 608-614, 1982.

DUTRA, D.; KANE, M.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 235-243, 2009.

GODO, T.; KOMORI, M.; NAKAOKI, E.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, p. 323-328, 2010.

KAUTH, P. J.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. A.; REINHARDT – ADAMS, C. Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. **Annals of Botany**, v.102, p.783-793, 2008.

KAUTH, P. J.; VENDRAME, W. A.; KANE, M. E. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 91–102, 2006.

KERBAUY, G. B. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua. 2011. 383p.

KITSAKI, C. K.; ZYGOURAKI, S.; ZIOBORA, M.; KINTZIOS, S. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature *versus* immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 284-290, 2004.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

LEE, Y. I.; LU, F. L.; YEUNG, E. C.; CHUNG, M. C. Developmental change in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, p. 246-252, 2007.

LO, S. H.; NALAWADE, S. M.; KUO, C. L.; CHEN, C. L.; TSAY, H. S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, v. 40, p. 528-535, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a 6 threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

PARTHIBHAN, S.; BENJAMIN, J. H. F.; MUTHUKUMAR, M.; SHERIF, N.A.; SENTHIL, K. T.; RAO, M. V. Influence of nutritional media and photoperiods on *in vitro* asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aequum* Lindley. **African Journal of Plant Science**, v. 6, p. 383-393, 2012.

PEDROZA-MANRIQUE, J.; MICAN-GUTIERREZ, Y. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb. F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, p. 543-547, 2006.

SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. de; VENTURA, M. U.; SORACE, M. Substratos e extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas brasileiras *Cattleya intermedia* (John Lindley) e *Miltonia clowesii* (John Lindley) (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 139-143, 2010.

SHIN, K. S.; MURTHY, H. N.; HEO, J. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 339-343, 2008.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2275-2284, 2014.

STEWART, J. Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. In: H. W. Pritchard (ed.). **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press: Cambridge, 1989. p. 147-183.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006.

STOUTAMIRE W. Terrestrial orchid seedling. In: WITHNER, C.L (ed): **The orchids: Scientific studies**. New York: Wiley-Interscience, 1974. p. 101–128.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NACABASHI, M.; FERREIRA, W. M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, p. 657-666, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TSUTSUMI, C.; MIYOSHI, K.; YUKAWA, T.; KATO, M. Responses of seed germination and protocorm formation to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). **Botany**, v. 89, p. 841-848, 2011.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 496-504, 2010.

YAMAZAKI, J.; MIYOSHI, K. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 98, p. 1197-1206, 2006.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 198-209, 2012.

CAPÍTULO III – ÁGAR, CARVÃO E MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE ESPÉCIES DE *Dendrobium*

RESUMO

A capacidade das sementes de orquídeas germinarem em meios assimbióticos é uma alternativa viável e relevante para produção de espécies e híbridos comercialmente importantes. Objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de ágar e carvão ativado em meios assimbióticos, que propiciem, *in vitro*, a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*. Foram utilizados, como meio de cultura para germinação das sementes, os meios MS, MS ½, K e VW, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, acrescidos com diferentes concentrações de carvão ativado (0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0 g L⁻¹) e solidificados com 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 4 x 5 x 5 (quatro meios de cultura, cinco concentrações de ágar e cinco concentrações de carvão ativado), com três repetições constituídas de um frasco de cultivo. Aos quarenta e cinco dias após a semeadura avaliou-se a porcentagem de germinação e o desenvolvimento dos protocormos das espécies estudadas. As sementes das duas espécies germinaram em todos os meios de cultivos e em todas as combinações de ágar e carvão ativado estudadas. Os meios MS e MS ½ foram os mais efetivos em promover a germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*. Para obtenção de plântulas mais desenvolvidas recomenda-se a utilização dos meios MS e MS ½ geleificados com 4,0 a 8,0 g L⁻¹ de ágar e isentos de carvão ativado.

Palavras-chave: Orchidaceae, agente geleificante, germinação assimbiótica.

AGAR, CHARCOAL AND CULTURE MEDIA IN GERMINATION AND INITIAL DEVELOPMENT OF *Dendrobium* SPECIES SEEDLINGS

ABSTRACT

The capacity of orchids seeds to germinate in asymbiotic media is a viable and relevant alternative for the production of commercially important species and hybrids. This study aimed to evaluate the effect of concentrations of agar and activated charcoal in asymbiotic media, that provide *in vitro* germination and seedling development of *Dendrobium nobile* and *Dendrobium phalaenopsis*. We were used as culture medium for seed germination MS, MS ½ K and VW media, supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose plus activated charcoal with different concentrations (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 or 6.0 g L⁻¹) and solidified with 0.0; 2.0; 4.0; 6.0 or 8.0 g L⁻¹ bacteriological agar. The experimental design used was randomized and the treatments were arranged in a factorial 4 x 5 x 5 (four culture media, five agar concentrations and five activated charcoal concentrations) with three replications constituted a culture flask. At forty-five days after sowing were evaluated the germination percentage and protocorms development of the studied species. The seeds of both species germinated in all media cultivations and all combinations of agar and charcoal studied. The MS and MS ½ media were the most effective in promoting *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* and *Dendrobium phalaenopsis*. To obtain more developed seedling is recommended the use of MS and MS½ media jellified with 4.0 to 8.0 g L⁻¹ agar and free of activated charcoal.

Key-words: Orchidaceae, gelling agent, asymbiotic germination.

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de cultivo *in vitro* têm sido amplamente utilizadas na propagação de orquídeas (SUZUKI et al., 2010) sendo que a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas é realizada desde o início do século passado, quando Knudson (1922) descreveu a germinação em meio de cultura asséptico.

O sucesso na aplicação dos métodos de cultivo *in vitro* deve-se à melhor compreensão das necessidades nutricionais do material a ser propagado. A formulação do meio de cultivo é essencial para a germinação, pois fornece constituintes necessários a cada etapa desse processo, uma vez que as respostas germinativas variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, que podem ser específicas nas diferentes etapas do desenvolvimento (DAMON et al., 2004; STEWART & KANE, 2006; TEMJENSANGBA & DEB, 2006; PAUL et al., 2012). Para a semeadura *in vitro* do gênero *Dendrobium*, Silva et al., (2015a) em sua revisão citam que os quatro meios de cultura mais utilizados são MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), MS ½ (MS na metade da concentração de sais), Knudson C (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN WENT, 1949) respectivamente.

Dentre os componentes que podem enriquecer os meios de cultura está o carvão ativado, que tem a capacidade de adsorção de substâncias tóxicas presentes no meio ou formadas durante a oxidação de compostos fenólicos ao longo do cultivo *in vitro* (FARIA et al., 2012), porém durante essa adsorção as vitaminas e reguladores de crescimento também podem ser retidos, dependendo da concentração de carvão utilizada (CID & TEIXEIRA, 2010).

Ao se estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro*, a consistência dos meios de cultura também deve ser considerada, uma vez que a difusão dos nutrientes para a semente aumenta ou diminui em função da concentração do agente geleificante utilizado (FARIA et al., 2012). O ágar é o agente geleificante mais utilizado na solidificação dos meios de cultura para germinação *in vitro* de *Dendrobium* (SILVA et al. 2015b). Cid & Teixeira (2010) atribuem isto à vantagem deste solidificante de ser solúvel em água, além de tornar-se líquido a 100 °C e solidificar-se a 45 °C, permanecendo semissólido a temperatura ambiente. Apesar das vantagens apresentadas pelo ágar é necessário o estabelecimento de uma concentração em cada meio de cultivo que possibilite elevados percentuais germinativos e o desenvolvimento satisfatório de cada espécie.

Diante do exposto objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de ágar e carvão ativado em meios assimbióticos, que propiciem, *in vitro*, a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. e *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido entre julho e setembro de 2014. Foram utilizados como material de estudo, frutos maduros, oriundos da polinização manual das espécies de orquídeas *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*, provenientes de matrizes com mais de oito anos, cultivadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando radiação fotossintética média diária de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, e provido de irrigação por microaspersão.

Os frutos foram destacados das matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e levados para o laboratório de cultivo *in vitro* da FCA/UFGD, onde foram desinfestados com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, dois frutos de cada espécie foram abertos com auxílio de bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes de cada espécie foram embaladas separadamente em papel alumínio e armazenadas, sob refrigeração ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) em frascos de polipropileno opaco providos de tampa com sílica gel¹.

Foram utilizados, como meio de cultura para germinação das sementes, os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); MS ½ (MS na metade da concentração de sais); Knudson C (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN WENT, 1949). Os meios de cultivo foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, acrescidos com 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado e solidificados com 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou $8,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia). O pH dos meios foi aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência foram distribuídos em frascos de polipropileno com tampa rosqueável e capacidade de 50 mL (altura= 5 cm; diâmetro da boca = 5 cm), sendo que cada frasco recebeu 20 mL de meio de cultivo.

Posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento os frascos foram transferidos para

¹ Metodologia de armazenamento de sementes utilizada para o gênero *Dendrobium*, pelo Laboratório de Cultivo *in vitro*/FCA por até 12 meses

ambiente estéril.

Foi realizado o teste de tetrazólio das espécies, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2014). Comprovada a viabilidade das sementes, foi pesada uma amostra de 35 mg de sementes de cada espécie. As amostras foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 105 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%. As amostras permaneceram imersas na solução de hipoclorito por cinco minutos (5')². Após este período, as suspensões de sementes foram diluídas para 350 mL com água destilada estéril e em seguida receberam tríplice lavagem com água destilada estéril³ (280 mL por lavagem) e, após este procedimento o volume dessas suspensões foi completado para 350 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1000 µL da suspensão de sementes por frasco, contendo em média 185,0 sementes de *D. nobile* e 138,0 sementes de *D. phalaenopsis*.

Após a inoculação, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25±2°C; 16 h), o *D. nobile* permaneceu sob lâmpada fluorescente branca (18,9 µmol m⁻² s⁻¹ - irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W cada)⁴ e o *D. phalaenopsis* sob lâmpada fluorescente branca + lâmpada fluorescente vermelha (14,85 µmol m⁻² s⁻¹ - irradiância fornecida por uma lâmpada fluorescente branca de 40 W e uma lâmpada fluorescente vermelha de 30 W Gro-lux®)⁴.

Quarenta e cinco dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação das espécies pesquisadas, os propágulos contidos nos frascos foram lavados com 3 mL de água destilada estéril e acondicionados em placas de acrílico (2 x 2 x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 x 0,5 cm) e, com auxílio de microscópio estereoscópico binocular com zoom, foram contados o número de sementes não germinadas (NS) e o número de protocormos clorofilados (NPC). A porcentagem de germinação (%G) foi calculada pela seguinte expressão: $\%G = [NPC / (NS + NPC)] \times 100$. Após contagem, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada ao microscópio estereoscópico, com auxílio do programa computacional AxionVision versão 3.1 (Zeiss®), para avaliação visual do desenvolvimento inicial das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 4 x 5 x 5 (quatro meios de cultura,

² O tempo de desinfestação das sementes foi determinado em função dos resultados observados no Capítulo 1 deste Protocolo.

³ A tríplice lavagem das sementes com água destilada estéril foi utilizada em função dos resultados observados no Capítulo 1 deste Protocolo.

⁴ A condição de luminosidade foi escolhida em função dos resultados observados no capítulo 2 deste Protocolo.

cinco concentrações de ágar e cinco concentrações de carvão ativado), com três da porcentagem de germinação foram transformados para $\sqrt{(x + 1)}$ e, a seguir, foram submetidos à análise de variância sendo os fatores qualitativos comparados pelo teste de Tukey até 5% e os quantitativos por regressão, com auxílio do programa SAEG – Sistema para Análises Estatísticas (RIBEIRO JUNIOR, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito isolado (exceção feita ao carvão quando estudado em *D. phalaenopsis*) e conjunto, dos três fatores estudados, sobre a porcentagem de germinação (%G) das duas espécies de orquídeas (Quadro 2).

QUADRO 2. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*. Dourados – MS, UFGD, 2015.

F.V.	G.L.	Porcentagem de germinação	
		Quadrados médios	
		<i>D. nobile</i>	<i>D. phalaenopsis</i>
Meio de cultura (MC)	3	4,55**	1,42**
Ágar (A)	4	8,28**	6,71**
Carvão (C)	4	1,53**	0,14 ^{ns}
MC x A	12	2,50**	0,66*
MC x C	12	1,58**	1,81**
A x C	16	0,76**	0,73**
MC x A x C	48	0,69**	0,49*
Erro	200	0,22	0,30
CV (%)		6,6	5,9
Média Geral		71,3%	92,6%

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

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

^{ns} não significativo

A porcentagem média de germinação para *D. nobile* foi de 71,3% e para *D. phalaenopsis* foi de 92,6% (Quadro 2). As maiores %G para *D. nobile* foram obtidas com a utilização dos meios MS, MS ½ e K (iguais estatisticamente) e, para *D. phalaenopsis*, nos meios MS, MS ½ e VW (estatisticamente iguais) (Quadro 3).

Tanto a %G *in vitro* de *D. nobile* quanto a de *D. phalaenopsis* variou entre os meios de cultivo em função das concentrações de ágar e carvão utilizados (Figuras 1 e 2), embora os valores médios para alguns deles tenham sido estatisticamente iguais (Quadro 3).

QUADRO 3. Porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis* em função dos meios de cultura utilizados. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Meio de cultura	Porcentagem de germinação (%)	
	<i>D. nobile</i>	<i>D. phalaenopsis</i>
MS	72,8a	93,1a
MS ½	72,6a	93,5a
K	71,9a	90,6b
VW	67,6b	93,5a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey 5% de probabilidade)

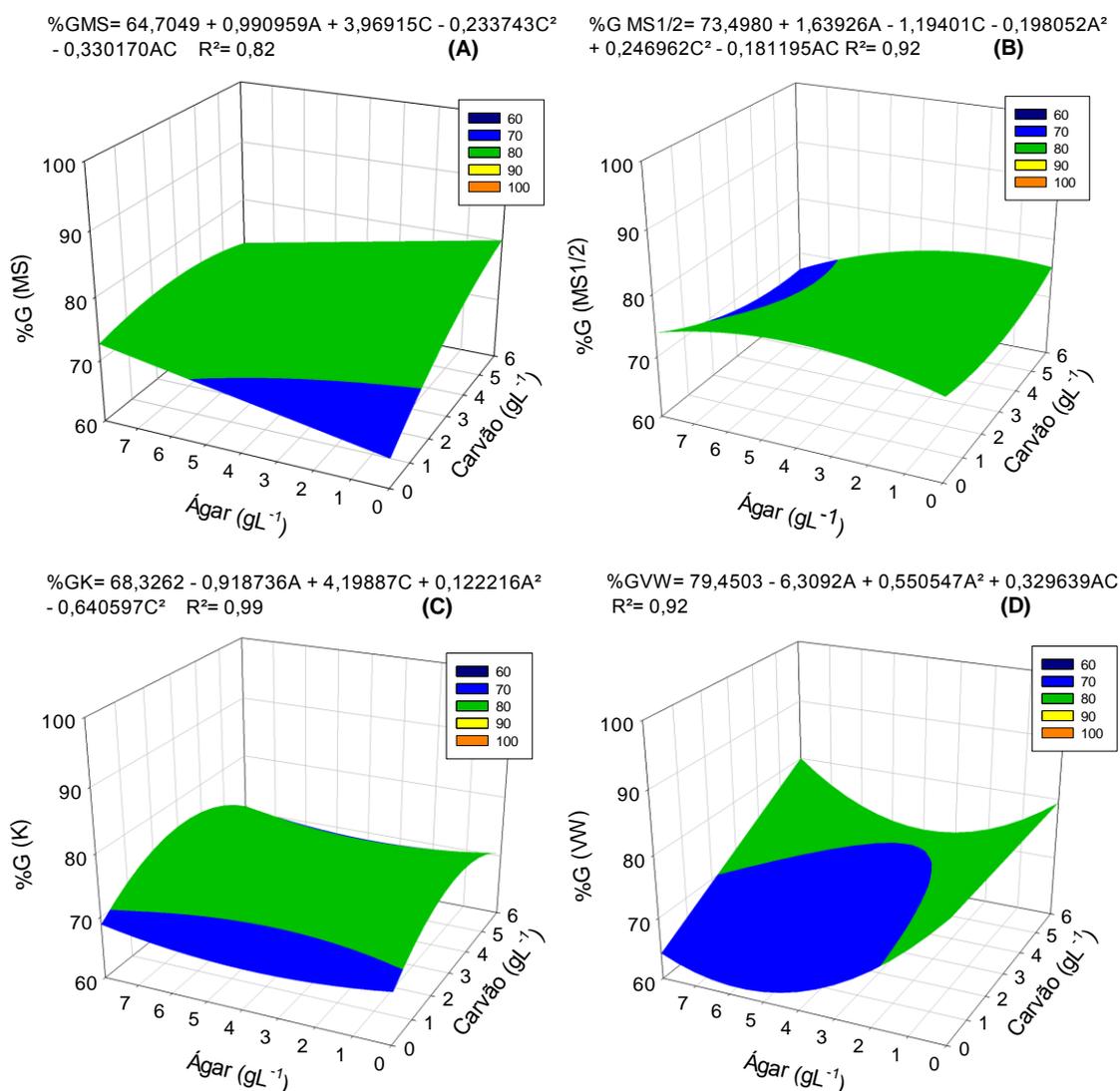


FIGURA 1. Porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Dendrobium nobile* nos meios de cultura: (A) Murashige & Skoog (MS); (B) Murashige & Skoog na metade da concentração de seus nutrientes (MS ½); (C) Knudson (K); (D) Vacin Went (VW) em função das concentrações de ágar e carvão utilizados. Dourados – MS, UFGD, 2015.

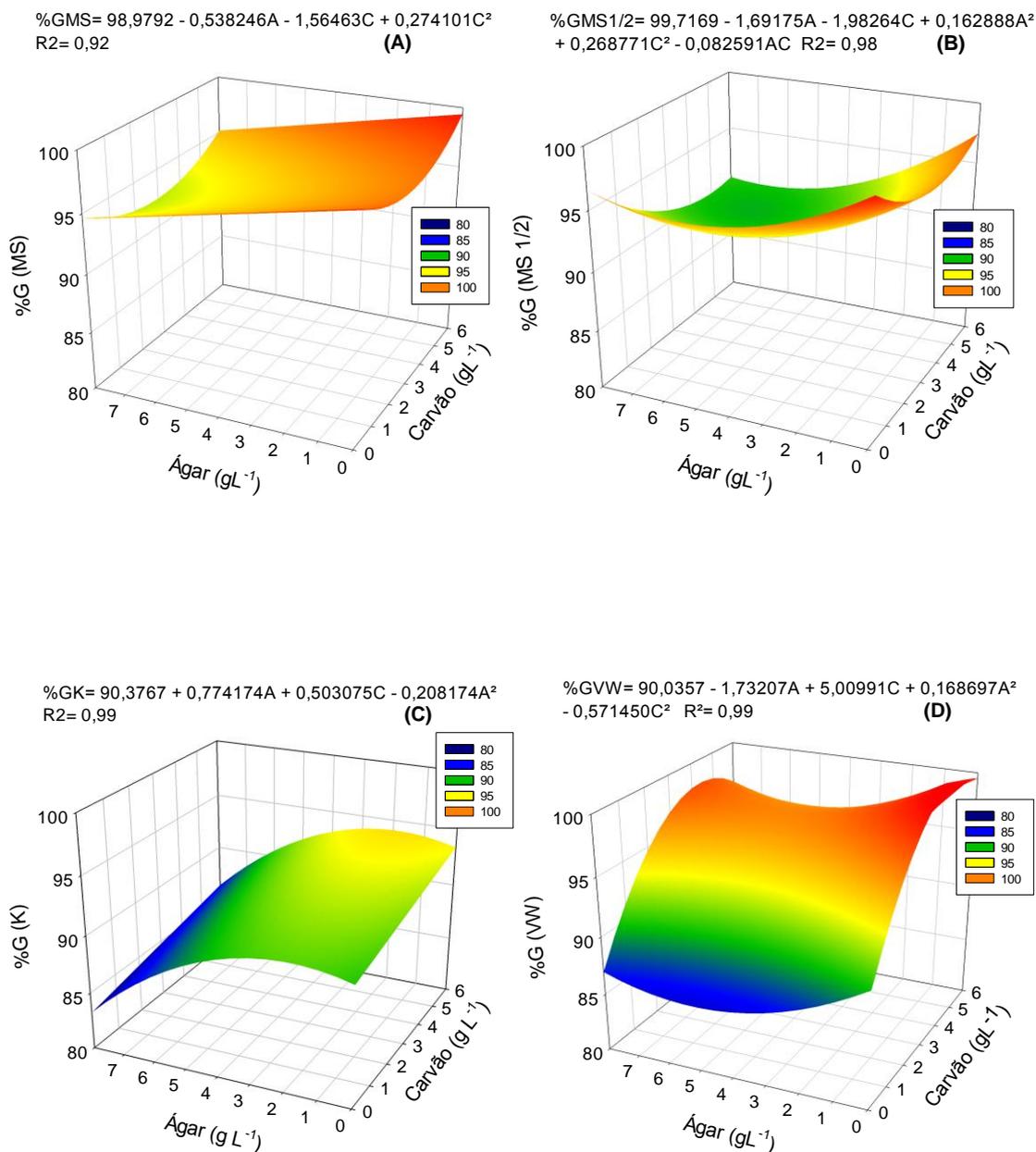


FIGURA 2. Porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Dendrobium phalaenopsis* nos meios de cultura: (A) Murashige & Skoog (MS); (B) Murashige & Skoog na metade da concentração de seus nutrientes (MS 1/2); (C) Knudson (K); (D) Vacin Went (VW) em função das concentrações de ágar e carvão utilizados. Dourados – MS, UFGD, 2015.

O quadro 4, apresenta as maiores e menores %G das duas espécies, observadas em função dos meios de cultura e das concentrações de ágar e de carvão estudadas.

QUADRO 4. Maiores e menores valores da porcentagem de germinação de sementes de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*, observados em função dos meios de cultura e das concentrações calculadas de ágar e carvão. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Meios de cultura	<i>D. nobile</i>					
	Ágar (gL ⁻¹)	Carvão (gL ⁻¹)	Maior %G ⁽¹⁾	Ágar (gL ⁻¹)	Carvão (gL ⁻¹)	Menor %G ⁽¹⁾
MS	0,0	6,0	80,0	0,0	0,5	65,0
VW	8,0	6,0	80,0	5,7	0,0	61,4
MS ½	4,1	0,5	76,0	8,0	6,0	67,0
K	0,2	3,3	75,0	3,8	0,0	66,5

Meios de cultura	<i>D. phalaenopsis</i>					
	Ágar (gL ⁻¹)	Carvão (gL ⁻¹)	Maior %G ⁽²⁾	Ágar (gL ⁻¹)	Carvão (gL ⁻¹)	Menor %G ⁽²⁾
VW	0,0	4,4	100,0	5,1	0,0	85,6
MS ½	0,0	0,0	99,7	5,2	3,7	90,0
MS	0,5	6,0	99,0	8,0	2,9	92,4
K	1,9	6,0	94,1	8,0	0,0	83,2

(1) Valores calculados em função das equações propostas na Figura 1

(2) Valores calculados em função das equações propostas na Figura 2

Não foi possível estabelecer um padrão comum de resposta de %G em função dos fatores estudados para as duas espécies. Enquanto para *D. nobile* não foi possível recomendar uma concentração de ágar, para *D. phalaenopsis* não foi possível recomendar uma concentração de carvão (Quadro 4).

Para *D. nobile* as maiores %G foram obtidas com concentrações de carvão de 6,0 g L⁻¹ nos meios MS e VW e as menores com concentrações de carvão variando de 0,0 a 0,5 g L⁻¹ nos meios MS, VW e K (Quadro 4). Para *D. phalaenopsis* as maiores %G foram obtidas com concentrações de ágar de até 0,5 g L⁻¹ nos meios VW, MS e MS ½ e, as menores com concentrações de ágar acima de 5,0 g L⁻¹ em todos os meios de cultivo (Quadro 4).

Os resultados desse trabalho demonstram que houve germinação de *D. nobile* e *D. phalaenopsis* em todas as composições dos meios de cultura utilizados. Resultados opostos foram encontrados por Soares et al. (2012), que observaram que a

germinação assimbiótica da espécie *Brassavola tuberculata* Hook ocorreu apenas em meio de cultura suplementado com carvão ativado.

Assim como no trabalho de Hossain et al. (2008), onde o carvão ativado aumentou a germinação de sementes de *Epidendrum ibaguense*, os resultados encontrados nesse trabalho para *D. nobile* também foram positivos em relação ao aumento da %G com a utilização de até 6,0 g L⁻¹ de carvão ativado nos meios de cultura (Quadro 4). Esses autores salientam que a alta afinidade de adsorção para compostos excessivos e inibidores do carvão ativado, além do escurecimento dos meios de cultivo podem ser responsáveis na promoção do processo germinativo.

De maneira geral, quando se utilizou meio líquido foram observados os maiores valores de %G para as duas espécies (salienta-se que para *D. nobile* a utilização de 0,0 e 8,0 g L⁻¹ de ágar, nos meios MS e VW, propiciaram a mesma %G - Quadro 4) . Conforme Faria et al. (2012), o meio líquido pode promover maior difusão dos nutrientes para as sementes, possibilitando os altos valores de %G observados.

Em relação ao desenvolvimento dos propágulos é importante salientar que a utilização dos meios MS e MS ½ líquidos (acrescidos de 0,0 g L⁻¹ de carvão e de até 2,0 g L⁻¹ de ágar) retardou o desenvolvimento, sendo observados protocormos em estágio 1 (protocormo intumescido clorofilado) e plântulas em estágio 2 (plântula com formação da primeira folha) conforme classificação de Suzuki et al. (2009) (Figuras 3 e 4). Nesses mesmos meios, a partir da utilização de 4,0 g L⁻¹ de ágar (meio semissólido), pode-se observar plântulas em estágio mais avançado de desenvolvimento, apresentando formação de duas folhas (estádio 3) (Figuras 3 e 4).

Essas observações permitem inferir que meios solidificados são essenciais para o cultivo inicial das espécies estudadas, pois meios com baixa concentração de ágar podem dificultar o posicionamento das plântulas no frasco (FARIA et al., 2012), o que pode atrasar o seu crescimento e desenvolvimento.

Embora a utilização de 6,0 g de carvão tenha propiciado maiores %G tanto para *D. nobile* como para *D. phalaenopsis* no meio MS, o carvão retardou o crescimento e o desenvolvimento dos protocormos e plântulas, que foram visivelmente menores apresentando-se em estádios 1 e 2 de desenvolvimento, enquanto que o mesmo meio isento de carvão propiciou plântulas maiores e mais desenvolvidas classificadas em estágio 2 e 3 (Figuras 3 e 4). O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultivo em concentrações de 0,2 a 3% (FARIA et al., 2012; CID & TEIXEIRA, 2010) e, segundo Pasqual et al. (1997) embora não seja um regulador de crescimento, sua

presença modifica a composição do meio de cultura, podendo promover e/ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizados.

Segundo Thomas (2008) e Guson et al. (2012), o carvão ativado pode atuar na adsorção de vitaminas, íons metálicos e reguladores de crescimento, retendo tanto substâncias inibidoras quanto promotoras do crescimento, fazendo com que a liberação das mesmas seja mais lenta e resultando em efeitos positivos ou negativos para o desenvolvimento, dependendo da espécie. A adsorção promovida pelo carvão também pode reter íons como Cu e Zn presentes no meio (CID & TEIXEIRA, 2010). O Zn desempenha importante função no metabolismo de crescimento vegetal e, segundo alguns autores, existe a necessidade do aumento da disponibilidade desse nutriente no meio de cultura para melhor crescimento das diferentes espécies (FIGUEIREDO et al., 2007; VILLA et al., 2014).

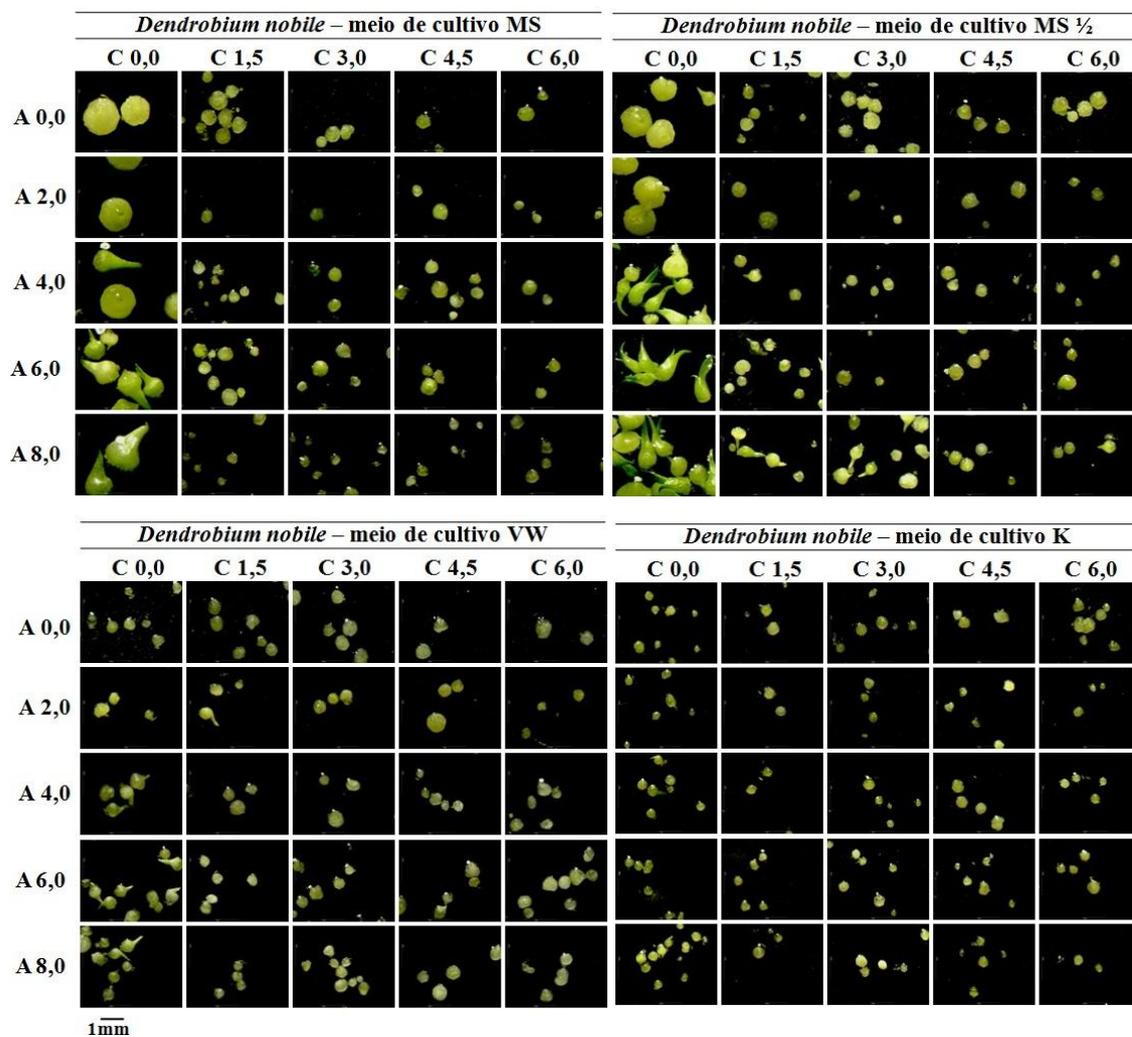


FIGURA 3. Sementes, protocormos e plântulas de *Dendrobium nobile* aos 45 dias, em diferentes meios de cultura, concentrações de ágar e carvão ativado. Dourados – MS, UFGD, 2015.

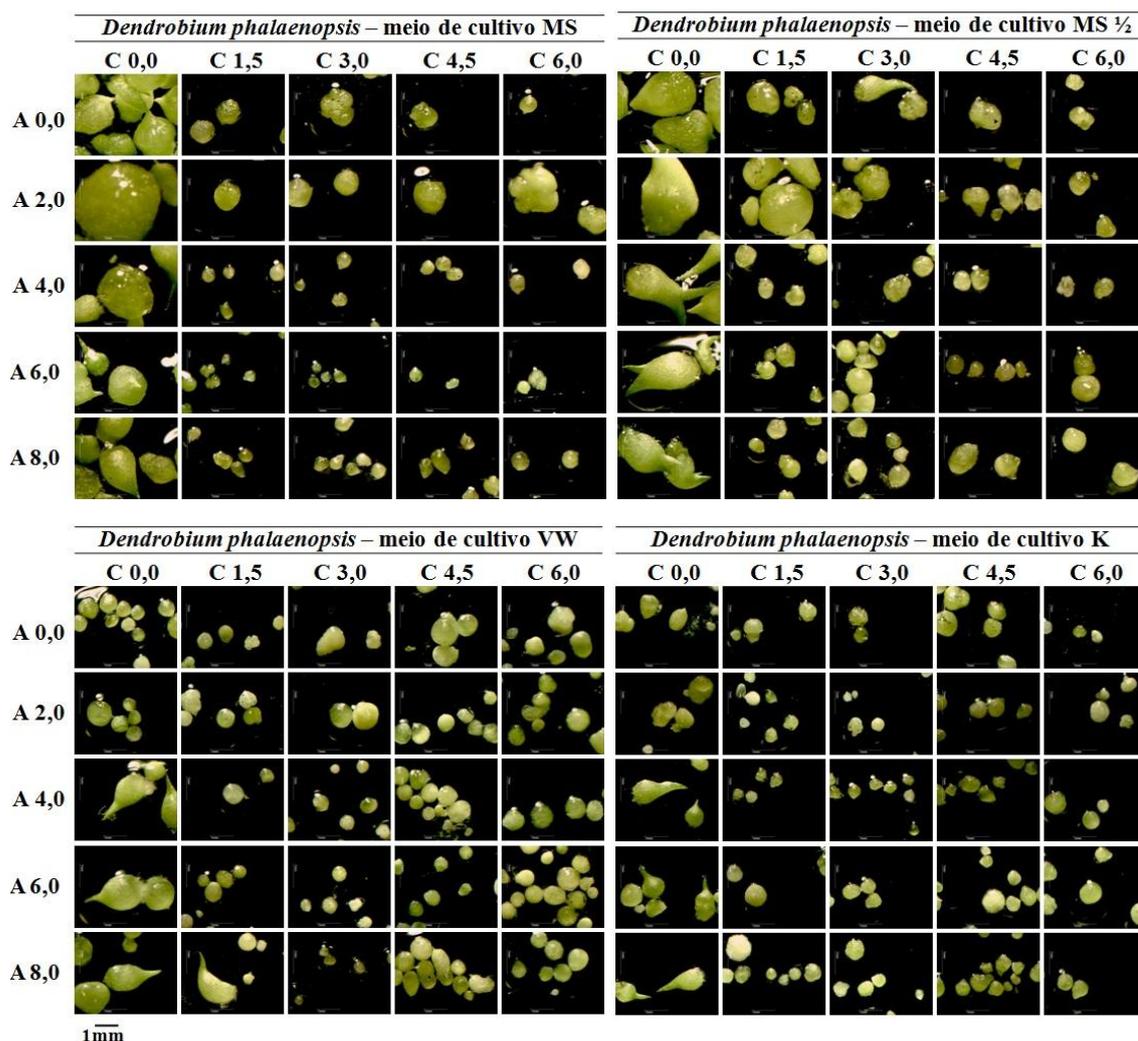


FIGURA 4. Sementes, protocormos e plântulas de *Dendrobium phalaenopsis* aos 45 dias, em diferentes meios de cultura, concentrações de ágar e carvão ativado. Dourados – MS, UFGD, 2015.

Villa et al., (2014) observaram que crescentes concentrações de carvão ativado incorporado ao meio Knudson influenciaram negativamente a morfogênese foliar de *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow e atribuíram este efeito a associação do uso de meio sólido, que inibe a difusão de fósforo, potássio e zinco, com concentrações elevadas de carvão ativado, que podem ter inibido a formação de folhas por carência desses elementos que são requeridos na formação de órgãos. Galdiano Júnior et al. (2012) também citam efeitos negativos da incorporação do carvão no meio de cultura, sendo alguns deles a remoção de nutrientes orgânicos, fitormônios e inibição do crescimento e da morfogenia das espécies cultivadas.

Araújo et al. (2006) salientam que o efeito não-seletivo do carvão ativado pode proporcionar resultados negativos na micropropagação. A diversidade de resultados obtidos com a utilização de carvão ativado nas diferentes espécies da família

Orchidaceae deve-se, principalmente, ao genótipo em questão, à adsorção de algumas substâncias químicas e compostos orgânicos, além de metabólitos tóxicos liberados no cultivo *in vitro* (WANG & HUANG, 1976; ARAÚJO et al., 2006; GALDIANO JÚNIOR et al., 2012; PRIZÃO et al., 2012; VILLA et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Os meios MS e MS ½ foram os mais efetivos em promover a germinação *in vitro* de *Dendrobium nobile* e *Dendrobium phalaenopsis*; Para obtenção de plântulas mais desenvolvidas recomenda-se a utilização dos meios MS e MS ½ geleificados com 4,0 a 8,0 g L⁻¹ de ágar e isentos de carvão ativado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.; ROCHA, H. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 2, p. 53-106, 2006.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15-43.

DAMON, A.; AGUILAR-GUERRERO, E.; RIVERA, L.; NIKOLAEVA, V. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de três espécies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. **Revista Chapingo: Série Horticultura**, v. 10, p.195-203, 2004.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012.124p.

FIGUEIREDO, M. A.; SANTOS, F. M.; SILVA, J. O. C.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 294-296, 2007.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 801-807, 2012.

GUSON, R. R.; MORAES, C. P.; RONCONI, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* Hook. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 5, p. 551-563, 2012.

HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth.(Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3614-3619, 2008.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 1-25, 1922.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações - introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

PRIZÃO, E. C.; GONÇALVES, L. D. M.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. D. F. P. D. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence'. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 157-161, 2012.

RIBEIRO JUNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301 p.

SILVA, J. A. T.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. *Dendrobium micropropagation*: a review. **Plant cell reports**, v. 34, p. 671-704, 2015b.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015a.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 617-623, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; TATARA, M. B.; SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2275-2284, 2014.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 86, p.147-158, 2006.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NACABASHI, M.; FERREIRA, W. M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V. P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, v. 36, p. 657-666, 2009.

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocormo-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p. 223-228, 2006.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio Knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 683-694, 2014.

WANG, P. J.; HUANG, L. C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 12, p. 260-262, 1976.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se os seguintes Protocolos.

1. Protocolo de germinação para *Dendrobium nobile* Lindl.:

O fruto de *Dendrobium nobile* deve ser destacado de plantas matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e desinfestado com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, deve ser aberto com auxílio de um bisturi e as sementes retiradas, homogêneas e acondicionadas em dessecador com sílica gel (25 ± 2 °C; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes podem ser utilizadas no cultivo *in vitro*. Antes da sementeira deve ser realizado o teste de tetrazólio da espécie, segundo a qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, são colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebe 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes são acondicionadas em ambiente desprovido de luz, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio são acrescidas de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio estereoscópico. São consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis. Para cada amostra são realizadas três leituras, sendo posteriormente calculada a média entre elas, obtendo os valores médios de sementes viáveis.

O meio de cultura recomendado para germinação dessa espécie é o meio MS, podendo ser solidificados com a utilização de 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio deve ser aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência distribuído em frascos de cultivo. Posteriormente, os frascos devem ser esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento, os frascos são transferidos para ambiente estéril. Na sequência, em ambiente asséptico, para cada 5 mg de sementes da espécie recomenda-se como agente desinfestante 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, permanecendo imersa na solução de hipoclorito por 5 minutos. Após este período, a suspensão de sementes deve ser diluída para 50 mL com água destilada estéril. Em seguida deve ser realizada a tríplex lavagem com água

destilada estéril (40 mL por lavagem) e, após este procedimento o volume dessa suspensão precisa ser completado novamente para 50 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura pode ser realizada com auxílio de um pipetador automático.

Após a inoculação, recomenda-se que as culturas sejam acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C; 16 h), permanecendo sob lâmpada fluorescente branca + lâmpada fluorescente vermelha ($14,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – irradiância fornecida por uma lâmpada fluorescente branca de 40 W e uma lâmpada fluorescente vermelha de 30 W Gro-lux®) e após quarenta e cinco dias pode ser verificada a germinação das sementes.

2. Protocolo de germinação para *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg:

Para o *Dendrobium phalaenopsis*, o fruto deve ser destacado de plantas matrizes com auxílio de uma tesoura de poda manual e desinfestado com solução de álcool etílico 70%. Em seguida, deve ser aberto com auxílio de um bisturi e as sementes retiradas, homogeneizadas e acondicionadas em dessecador com sílica gel (25 ± 2 °C; 75% UR) por 14 dias. Após a dessecação, as sementes podem ser utilizadas no cultivo *in vitro*. Antes da semeadura deve ser realizado o teste de tetrazólio da espécie, segundo a qual, três porções de sementes, de 5 mg cada, são colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebe 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio (0,5%). As suspensões de sementes são acondicionadas em ambiente desprovido de luz, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após 24 horas, as suspensões de tetrazólio são acrescidas de 7 mL de água destilada estéril e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação e contagem de sementes potencialmente viáveis em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio estereoscópico. São consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis. Para cada amostra são realizadas três leituras, sendo posteriormente calculada a média entre elas, obtendo os valores médios de sementes viáveis.

O meio de cultura recomendado para germinação dessa espécie é o meio MS, podendo ser solidificados com a utilização de 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio deve ser aferido e ajustado para 5,8 utilizando-se HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) e na sequência distribuído

em frascos de cultivo. Posteriormente, os frascos devem ser esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após o resfriamento, os frascos são transferidos para ambiente estéril. Na sequência, em ambiente asséptico, para cada 5 mg de sementes da espécie recomenda-se como agente desinfestante 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, permanecendo imersa na solução de hipoclorito por 5 minutos. Após este período, a suspensão de sementes deve ser diluída para 50 mL com água destilada estéril. Em seguida deve ser realizada a tríplice lavagem com água destilada estéril (40 mL por lavagem) e, após este procedimento o volume dessa suspensão precisa ser completado novamente para 50 mL com água destilada estéril para a semeadura *in vitro*. A semeadura pode ser realizada com auxílio de um pipetador automático.

Após a inoculação, recomenda-se que as culturas sejam acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 2 °C; 16 h), permanecendo sob lâmpada fluorescente branca ($18,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W cada). Quarenta e cinco dias após a semeadura pode ser verificada a germinação das sementes.