

DONIZETTI TOMAZ RODRIGUES

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS SEM A
UTILIZAÇÃO DE CÂMARA DE FLUXO LAMINAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696p
2009

Rodrigues, Donizetti Tomaz, 1977-

Propagação *in vitro* de orquídeas sem a utilização de
câmara de fluxo laminar / Donizetti Tomaz Rodrigues.
– Viçosa, MG, 2009.
xi, 50f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Roberto Ferreira de Novais.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

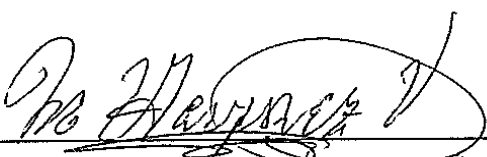
1. Orquídeas - Propagação in vitro. 2. *Epidendrum*.
3. *Dendrobium*. 4. Tecidos vegetais - Cultura e meios de
cultura. 5. Orquídeas. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

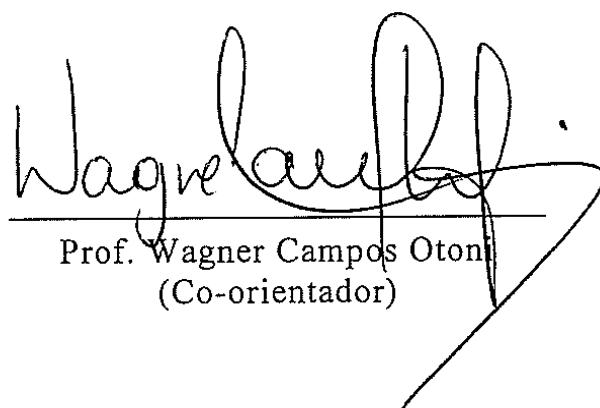
CDD 22.ed. 635.93415

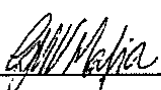
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS SEM A
UTILIZAÇÃO DE CÂMARA DE FLUXO LAMINAR**

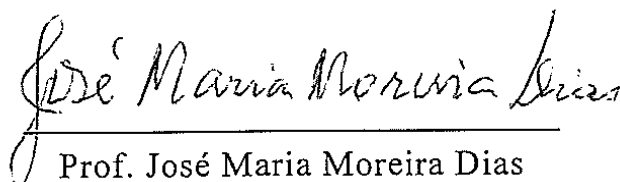
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

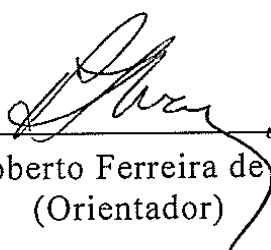
APROVADA: 22 de dezembro de 2009.


Prof. Víctor Hugo Álvarez V.
(Co-orientador)


Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)


Prof.ª Gizella Machado Ventura Mafia


Prof. José Maria Moreira Dias


Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Orientador)

A minha esposa *Laura*,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem.

A minha esposa Laura por todo apoio incondicional e fundamental.

Aos meus pais pela confiança e dedicação.

Aos meus professores e amigos Víctor Hugo, Roberto Ferreira de Novais, Wagner Otoni e José Maria, por toda a dedicação e confiança.

A D. Neuza, sr. João, Josélia e João pela acolhida e amizade.

Aos laboratoristas e amigos Carlos Fonseca, Quintão e Cláudio por toda a dedicação, amor ao trabalho e companheirismo.

Ao Gustavo, André, Gizella, Marcus e Evair pela amizade e auxílio nos trabalhos.

Aos colegas de pós-graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos demais professores e funcionários do departamento de solos.

A Universidade Federal de Viçosa, aos Departamentos de Solos e Biologia Vegetal e a CAPES.

BIOGRAFIA

DONIZETTI TOMAZ RODRIGUES, filho de Geraldo Tomaz Rodrigues e Maria Aparecida Rodrigues, nasceu em Presidente Olegário, MG, em 19 de Novembro de 1977.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, em março de 2003.

Em julho de 2005, defendeu o Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2005 iniciou seu Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya Intermedia</i> COM DESINFESTAÇÃO QUÍMICA, SEM O USO DE CÂMARA DE FLUXO LAMINAR	3
RESUMO	3
SUMMARY	4
INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
CONCLUSÕES	15
LITERATURA CITADA	15

CAPÍTULO 2	17
USO DE DESINFESTANTES QUÍMICOS NA MICROPRO- PAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Arundina bambusifolia</i> E <i>Epidendrum</i> <i>ibaguenses</i>	17
RESUMO	17
SUMMARY	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
CONCLUSÕES	27
LITERATURA CITADA	28
CAPÍTULO 3	30
PROPAGAÇÃO DE <i>Phalaenopsis</i> spp. E <i>Dendrobium nobile</i> EM DIFERENTES MEIOS, UTILIZANDO-SE SERINGAS DESCAR- TÁVEIS	30
RESUMO	30
SUMMARY	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	36
<i>Phalaenopsis</i> spp.	36
<i>Dendrobium nobile</i>	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	46
LITERATURA CITADA	47
CONCLUSÕES (GERAIS)	49

RESUMO

RODRIGUES, Donizetti Tomaz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Propagação *in vitro* de orquídeas sem a utilização de câmara de fluxo laminar.** Orientador: Roberto Ferreira de Novais. Co-orientadores: Víctor Hugo Alvarez V. e Wagner Campos Otoni.

Há uma grande demanda por técnicas de laboratório mais simples e de menor custo e por procedimentos mais acessíveis a orquidófilos que não têm o embasamento teórico necessário à utilização de métodos usuais de produção seminífera e clonal de orquídeas *in vitro*. Neste trabalho, três experimentos foram conduzidos com os objetivos de avaliar a desinfestação química com hipoclorito de sódio (NaClO) de sementes e de tecidos de orquídeas para a produção de mudas *in vitro*, e testar a utilização de seringa descartável para o cultivo de tecidos, de modo a dispensar, em todos os casos, o uso de câmara de fluxo laminar. No primeiro experimento, sementes de *Cattleya intermedia* foram tratadas com seis concentrações de NaClO, variando de 1,2 a 4.800 mg L⁻¹ de NaClO e semeadas utilizando-se dois métodos de cultivo: inoculação de sementes em frascos via seringa descartável, através de um furo em tampa de

frascos de vidro, ou, abrindo-se o frasco, retirando-se a tampa, e colocando as sementes sobre o meio. Em ambos os métodos, as sementes foram inoculadas via 2 mL de suspensão semente-NaClO. Estes métodos foram comparados com o tradicional (controle), conduzido em câmara de fluxo laminar; com as sementes previamente desinfestadas com NaClO na concentração de 2.400 mg L⁻¹, corresponde a 100 mL L⁻¹ de água sanitária comercial (ASC), e enxaguadas em H₂O, mas sem a aplicação de NaClO aos meios nos frascos com as sementes. No segundo experimento, estudou-se a eficiência de concentrações de NaClO, variando de 1.200 a 6.000 mg L⁻¹ (50 a 250 mL L⁻¹ de ASC) aplicadas nos meios de cultura, na ausência ou presença de carvão ativado, em comparação à utilização de câmara de fluxo laminar sem a aplicação, neste caso, de NaClO nos meios, com os tecidos (explantes). Foram utilizados explantes de duas espécies de orquídeas: *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses*. No terceiro experimento, estudou-se a utilização de seringa descartável, em substituição à câmara de fluxo laminar, utilizando três meios (MS1/2, GB5 e VW) e duas concentrações de três reguladores de crescimento (TDZ, ANA e BAP), para a obtenção de mudas de *Phalaenopsis* spp. e de um híbrido de *Dendrobium nobile*, via cultura de tecidos. Como tratamento controle, utilizou-se o meio MS1/2 com 1,0 mg L⁻¹ de TDZ em tubos de ensaio, com os explantes cultivados em condições normais, utilizando-se de câmara de fluxo. Não houve contaminação dos meios de cultura inoculados com a suspensão semente – NaClO. A presença do NaClO nas menores concentrações promoveu maior taxa de germinação e crescimento das plantas, em relação à sua não utilização (tratamento controle). A câmara de fluxo laminar mostrou-se desnecessária em relação à desinfestação feita com NaClO no meio de cultura. A aplicação de NaClO sobre o meio de cultura inoculado com os tecidos das plantas promoveu eficiente controle da contaminação. As maiores concentrações de NaClO causaram redução no crescimento das plantas. O uso de carvão ativado promoveu melhores resultados em termos de produção de plantas

mas, por outro lado, a contaminação foi maior em sua presença. A utilização de seringa descartável mostrou-se viável para a propagação vegetativa das plantas. Embora, com alguns efeitos médios significativos, a diferença entre meios de cultura, reguladores de crescimento e suas concentrações apresentaram tendência geral para a similaridade dos dados de crescimento das plantas, evidenciando a possível simplificação dos procedimentos de desinfestação e cultivo.

ABSTRACT

RODRIGUES, Donizetti Tomaz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2009. ***In vitro* propagation of orchids without using laminar flow.** Advisor: Roberto Ferreira de Novais. Co-advisors: Víctor Hugo Alvarez V. and Wagner Campos Otoni.

There is a great demand for simpler and less costly laboratory techniques and for more accessible procedures for orchid breeders who do not have the necessary theoretical basis to use the traditional seed and clone production methods of orchids *in vitro*. In this study, three experiments were conducted with the purpose of evaluating chemical disinfection with sodium hypochlorite (NaClO) of orchid seeds and tissues for seedling production *in vitro*, and to test the use of disposable syringes for tissue culture, to dispense with the use of laminar flow in all cases. In the first experiment, seeds of *Cattleya intermedia* were treated with six NaClO concentrations between 1.2 and 4,800 mg L⁻¹ NaCl, seeded by two methods: seed inoculation in glass jars with a disposable syringe through a hole in the lid, or by opening the jar, removing the lid, and placing the seeds on the medium. In both methods, seeds were inoculated in 2 mL seed – NaClO suspension. These methods were

compared with the traditional (control) method, using laminar flow. After previous disinfection with NaClO at a concentration of 2400 mg L⁻¹, corresponding to 100 mL L⁻¹ commercial bleach (CB), the seeds were rinsed in H₂O, but without NaClO application to the media in the jars with the seeds. In the second experiment the effectiveness of NaCl concentrations between 1200 and 6,000 mg L⁻¹ (50–250 mL L⁻¹ CB) for the tissues (explants) was tested, applied to culture media in the absence or presence of activated carbon, in comparison with the use of laminar flow without the NaClO application to the media. Explants of two orchid species, *Arundina bambusifolia* and *Epidendrum ibaguenses*, were used. The third experiment tested the use of disposable syringes, instead of laminar flow, in three media (MS1/2, GB5 and VW) and with two concentrations of three growth regulators (TDZ, NAA and BAP) for obtaining *Phalaenopsis* spp. seedlings and a *Dendrobium nobile* hybrid by tissue culture. In the control treatment, the MS1/2 medium was used with 1.0 mg L⁻¹ TDZ in test tubes, and the explants were cultured under normal conditions, using a flow chamber. No contamination was observed in the culture media inoculated with seed – NaClO suspension. At low NaClO concentrations the germination and plant growth rates were higher than in absence of NaClO (control). In comparison, it was found that the application of NaClO dispensed with the use of laminar flow. The contamination control with NaClO application to the culture medium inoculated with the plant tissues was efficient. The highest NaClO concentrations resulted in reduced plant growth. The use of activated carbon led to the best results in terms of plant production while on the other hand, contamination was higher in their presence. The use of disposable syringes was feasible for the vegetative propagation of plants. However, with some significant mean effects, the difference between culture media, growth regulators and their concentrations generally tended to data similarity regarding plant growth, suggesting a possible simplification of the sterilization and cultivation procedures.

INTRODUÇÃO GERAL

Há, entre os orquidófilos, de modo geral, um grande interesse pelos cruzamentos para a obtenção de novas plantas e a multiplicação (divisão somática) das melhores plantas (híbridos, espécies e variedades). Esta procura ansiosa por métodos que permitam dispor de práticas de obtenção de um número crescente de plantas com qualidade superior para a satisfação pessoal dos colecionadores e daqueles que fazem dessas plantas uma fonte de renda, esbarra em uma série de dificuldades: exigência de laboratórios sofisticados, com alto custo de implantação e manutenção, constituídos de aparelhagem de difícil operação, reagentes complexos de elevados custos, muitos ainda importados, procedimentos (protocolos) de difícil compreensão e execução, que exigem técnicos com larga experiência no assunto, o que implica dizer profissionais não facilmente encontrados no mercado e, quando o são, com elevados salários.

Tentativas de empresas de comércio de orquídeas no país, de médio a grande porte, fizeram tentativas infrutíferas nesta área apesar de, muitas delas, não terem limitação financeira.

Os livros sobre o assunto em português são excessivamente genéricos, dando uma informação mais qualitativa sobre o processo do que, de fato, informando sobre técnicas de maneira clara e conclusiva sobre o tortuoso e obscuro caminho das pedras para se chegar, com sucesso, a esses métodos de propagação de orquídeas em larga escala.

Outros livros estão em inglês, outro forte empecilho para um bom número daqueles envolvidos com a cultura.

Os artigos de pesquisa sobre o assunto, embora mais objetivos, são, com frequência, inacessíveis aos orquidófilos em geral e, quando o são, apresentam uma linguagem de grande complexidade para os não envolvidos com os processos científicos em geral.

Assim, procura-se com esta tese simplificar todos esses processos, desmistificando a imagem do “inacessível” que os orquidófilos têm sobre o problema que, como se verá, as soluções podem ser simples.

CAPÍTULO 1

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya Intermedia* COM DESINFESTAÇÃO QUÍMICA, SEM O USO DE CÂMARA DE FLUXO LAMINAR

RESUMO

A propagação de orquídeas *in vitro* é essencial para a produção de mudas em escala comercial. Dentre os equipamentos básicos utilizados nessa técnica a autoclave e a câmara de fluxo laminar, de elevados custos de aquisição, podem ser substituídos por técnicas simples, baratas e acessíveis a pequenos e médios produtores de orquídeas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade da desinfestação química de sementes e meio de cultura para propagação de orquídeas da espécie *Cattleya intermedia*, *in vitro*, sem a utilização de câmara de fluxo laminar. O ensaio constituiu-se de um fatorial $(2 \times 6) + 1$; com os tratamentos distribuídos em blocos ao acaso, com dez repetições, sendo dois métodos de inoculação de sementes e seis concentrações do desinfestante químico hipoclorito de sódio (NaClO), comparativamente ao método tradicional (controle: sem a aplicação de NaClO aos meios nos frascos), com as sementes desinfestadas com NaClO na concentração de 2.400 mg L^{-1} , correspondente a 100 mL L^{-1} (Água Sanitária Comercial – ASC) e posterior enxágue com H_2O e com a utilização de câmara de fluxo laminar). O NaClO foi testado nas concentrações de 1,2; 12 ; 120; 1.200; 2.400 e 4.800 mg L^{-1} , correspondentes a 0,05; 0,5; 5,0; 50; 100 e 200 mL L^{-1} de ASC. Duas técnicas de inoculação das sementes no meio de cultura foram testadas: por meio de uma seringa com as sementes em uma suspensão em água, em frascos com tampa metálica, com vedação de borracha, com um furo no centro, através do qual as sementes foram

injetadas ao meio, ou utilizando-se um béquer com as sementes em suspensão em água, em frascos com tampa metálica sem furo e sem vedação de borracha. Nesses dois métodos de semeadura, os meios já geleificados (frios) receberam 2 mL das soluções de NaClO, relativas às diversas concentrações, antes da inoculação com as sementes, via seringa, ou abrindo-se a tampa do frasco e transferindo a suspensão de sementes de um bequer sobre o meio de cultura. O uso de soluções de NaClO foi eficiente na germinação e posterior crescimento *in vitro* das plântulas oriundas de ambas as técnicas de inoculação, não ocorrendo contaminação em nenhum frasco. Além da efetiva descontaminação das sementes, o NaClO exerceu efeito benéfico sobre a produção de matéria fresca e número de plantas produzidas por frasco. A produção de matéria fresca de plântulas foi máxima quando as sementes foram inoculadas no meio de cultura na presença de 2 mL de uma solução de NaClO na concentração de 396 mg L⁻¹, produzindo 5,00 g/frasco de matéria fresca. No tratamento controle (sem NaClO junto à semente), a produção foi de apenas 1,67 g/frasco. A germinação sem o uso de câmara de fluxo laminar apresentou resultados superiores com redução de custos e simplificação de todo o processo.

Palavras chave: orquídea, meio de cultura, contaminação, água sanitária.

***IN VITRO* GERMINATION OF *Cattleya Intermedia* UNDER CHEMICAL DISINFECTION WITHOUT LAMINAR FLOW**

SUMMARY

In vitro propagation is essential for orchid seedling production on a commercial scale. Of the basic equipment used in this technique, the rather costly autoclave and laminar flow chamber may be replaced by simple and inexpensive techniques, accessible to small and medium orchid

producers. This study aimed to evaluate the effectiveness of chemical disinfection of seeds and growth medium for *in vitro* propagation of the orchid species *Cattleya intermedia*, without using laminar flow. The test consisted of a factorial combination $(2 \times 6) + 1$ of treatments arranged in randomized blocks with 10 replications, with two methods of seed inoculation and six concentrations of the chemical disinfectant sodium hypochlorite (NaClO), in comparison with the traditional method (control: without NaClO application to media in jars), using seeds disinfected with NaClO at a concentration of 2400 mg L^{-1} , corresponding to 100 mL L^{-1} (commercial bleach - CB) and subsequent rinsing with H_2O under laminar flow). NaClO was tested at concentrations of 1.2, 12, 120, 1200, 2400, and 4.800 mg L^{-1} , corresponding to 0.05, 0.5, 5.0, 50, 100, and 200 mL L^{-1} CB. Two techniques of seed inoculation into the culture medium were tested: (a) using a syringe containing the seeds in suspension in water for injection into the medium contained in jars with a rubber-sealed metal lid, with a hole in the center to insert the syringe or (b) using a beaker with the seeds in suspension in water, to be poured into jars with a metal lid without hole, without rubber sealing. In these two seeding methods, the already gelled (cold) media were treated with 2 mL of NaClO solutions in the different concentrations, before seed inoculation with the syringe, or by opening the jar lid and pouring the seed suspension from the beaker onto the culture medium. The use of NaClO solutions proved effective for germination and subsequent plantlet growth *in vitro* by both inoculation techniques; no contamination was observed in any jar. Besides the effective seed decontamination, the effect of NaClO on the fresh weight yield and number of plants produced per jar was beneficial. The fresh weight yield of seedlings was greatest when seeds were inoculated in the culture medium in the presence of 2 mL of a NaClO solution at a concentration of 396 mg L^{-1} , yielding 5.00 g/jar of fresh weight. In the control treatment (without NaClO in contact with the seed), production

was only 1.67 g/jar. The results of germination without using laminar flow were better, with lower costs and simplification of the entire process.

Key words: orchid, culture medium, contamination, chlorine bleach.

INTRODUÇÃO

Meios complexos como o de MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizado com frequência nos trabalhos científicos sobre o cultivo de tecidos *in vitro*, foi substituído por Novais & Rodrigues (2004) por misturas de sais p.a. contendo macro e micronutrientes, açúcar e ágar apenas, com resultados tão bons quanto aqueles obtidos com o meio MS, para a produção seminífera de orquídeas. Esses autores verificaram que mesmo formulações NPK simples, contendo impurezas de micronutrientes, em substituição aos meios tradicionais eram tão eficientes ou melhores que os meios mais complexos.

Na germinação *in vitro* de *Odontoglossum gloriosum*, o meio preparado com o fertilizante comercial Hydro-Coljap®⁽¹⁾ apresentou rápida germinação: 45 dias, comparativamente aos meios Knudson C (Knudson, 1922) (KC) com 133 dias, ou MS com 126 dias. Também houve melhor taxa de germinação com o meio Hydro-Coljap® (78,2 %), em relação ao MS (19,2 %) ou KC (2,6 %). O uso de carvão ativado no meio de cultivo apresentou resultados negativos quanto à taxa e ao tempo para germinação, em relação ao seu não-uso, resultado discordante para outras espécies de orquídeas cultivadas *in vitro* em que os melhores resultados foram obtidos na presença do carvão ativado. Considerando-se o meio MS, o menor tempo para germinação foi 85 dias e a germinação foi máxima (73 %) quando ao meio foram adicionados 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA; todavia, esses resultados ainda são inferiores em relação ao meio

⁽¹⁾ Fertilizante comercial para orquídeas e plantas ornamentais em geral.

preparado com Hydro-Coljap® sem reguladores de crescimento (Pedroza & Mican, 2006).

Mead & Bulard (1975) avaliaram a germinação de sementes de *Orchis laxiflora* e *Ophris sphegodes* em meio contendo as vitaminas tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e biotina. Dentre estas, observaram que apenas a tiamina trouxe resultado positivo à germinação da primeira espécie, sendo que a adição das demais vitaminas causaram pequena ou nenhuma resposta positiva.

Na germinação assimbiótica de sementes de *Cypripedium macranthos*, o uso de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ como agente desinfestante apresentou efeito benéfico em relação ao crescimento das plantas obtidas comparativamente ao uso de NaClO . Por outro lado, às sementes tratadas com baixa temperatura ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou com $1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cinetina apresentaram a maior taxa de germinação, cerca de 70 % (Miyoshi & Mii, 1998).

A germinação de sementes de orquídeas frequentemente é maior em solução com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ comparativamente ao NaClO ; o motivo para esta diferença é desconhecido (Rasmussen, 1992). Possivelmente, o maior efeito salino do Na em relação ao Ca seja uma das razões para essa diferença.

A concentração do agente desinfestante e tempo de exposição influenciaram diretamente a germinação de sementes das espécies: *Bifrenaria inodora* Lindl., *Brassavola tuberculata* Hook., *Cattleya bicolor* Lindl., *C. intermedia* R. Grah, *C. intermedia* var. *pallida* Lindl., *Encyclia pygmaea* (Hook.) Dressler, *Epidendrum fulgens* A. Brongn., *Laelia purpurata* Lindl. & Paxt, *Miltonia regnelli* Reichb., *Oncidium pumicum* Lindl., *Pleurothallis glumacea* Lindl. O aumento no tempo de exposição ao NaClO causou redução linear na germinação das sementes. Com 5 min de exposição ao NaClO ($0,4\text{ g L}^{-1}$) houve praticamente 100 % de germinação; por outro lado, a exposição por 60 min inibiu a germinação. Nesse trabalho, também foi avaliada a desinfestação gasosa das sementes, utilizando-se os gases formados com soluções de formaldeído (99 mL L^{-1})

e NaClO de sódio ($5,5 \text{ g L}^{-1}$), variando-se o tempo de exposição. Nestas condições, sementes de *Cattleya intermedia* apresentaram alta germinação ($> 85 \%$) com até 4 h de exposição aos vapores de formaldeído e NaClO (Alvarez-Pardo et al., 2006).

A aplicação de soluções desinfestantes com diferentes concentrações de NaClO ou H_2O_2 na forma de spray sobre sementes de *Bletilla striata*, *Cattleya loddigessi*, *Dendrobium kingianum*, *Habenaria radiata* e *Phalaenopsis* ssp. promoveram 100 % de germinação mesmo em concentrações altas de NaClO (6 g L^{-1}), não ocorrendo, portanto, mortalidade das sementes e, ou, contaminação do meio. Resultados semelhantes foram obtidos em explantes repicados com uso dessas soluções na forma de spray, sem perda de crescimento para as plântulas. Para H_2O_2 as respostas foram semelhantes quando se utilizou uma concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (0,01 %) tanto sobre o meio quanto na solução aplicada como spray sobre o meio (Yanagawa et al., 1995).

Em trabalhos com três orquídeas terrestres (*Dactylorhiza incarnata* subsp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* subsp. *maculata* e *Liparis loeselii*), a desinfestação das sementes com soluções de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (72 g L^{-1}) ou NaClO (6 g L^{-1}) por 40 a 50 min, mostraram alta eficiência do $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ na germinação destas sementes que foi, em média, o dobro em relação ao NaClO (Vejsadová, 2006).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a germinação, desenvolvimento e crescimento de plântulas de *Cattleya intermedia* na presença de concentrações crescentes de NaClO no meio de cultura, como método de desinfestação química, sem a utilização de câmara de fluxo laminar.

MATERIAL E METÓDOS

Para preparo do meio de cultura foram utilizados os sais do meio Gamborg 5 – GB5 (Gamborg et al., 1968), acrescidos de 20 g L^{-1} de

sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, 6 g L⁻¹ de ágar e 100 mL L⁻¹ de água de coco verde e pH ajustado em 5,5. Foram distribuídos 20 mL de meio em cada frasco de cultivo (520 mL de capacidade, com tampa metálica), posteriormente autoclavados a 121 °C por 20 min.

A solução de NaClO foi utilizada nas concentrações de 1,2; 12; 120; 1.200; 2.400 e 4.800 mg L⁻¹ equivalentes a 0,05; 0,5; 5,0; 50; 100 e 200 mL L⁻¹ água sanitária comercial (ASC) com 24 g L⁻¹ (2,4 %) de NaClO.

Para o primeiro método de semeadura (inoculação das sementes), os frascos tinham a tampa de metal, com vedação de borracha, com um furo no centro, através do qual as sementes em uma suspensão aquosa na seringa forem injetadas sobre o meio de cultura. Para o segundo método, foram utilizados os mesmos frascos sem perfuração da tampa (Figura 1).

A semeadura foi feita com a adição de 2 mL da solução contendo sementes e NaClO sobre os meios previamente esterilizados e já resfriados. A introdução das sementes nos frascos foi feita com o auxílio de uma seringa no primeiro método e com um béquer de vidro no segundo método sem a utilização de câmara de fluxo laminar. O método tradicional (controle) foi realizado em câmara de fluxo laminar onde as sementes foram desinfestadas com solução de NaClO a 2.400 mg L⁻¹ (100 mL L⁻¹ de ASC) lavadas com H₂O autoclavada e inoculadas em frascos contendo o mesmo meio de cultura utilizado nos demais tratamentos.

O ensaio, em blocos ao acaso, foi composto por um fatorial (2 x 6) + 1 sendo: dois métodos de inoculação de sementes e seis concentrações de NaClO, comparativamente ao método tradicional de germinação, com câmara de fluxo laminar (CFL).

Foram utilizadas 10 repetições para cada tratamento, sendo que cinco destas foram colhidas após dois meses de cultivo para contagem de sementes germinadas e o restante das repetições colhido aos oito meses de cultivo para avaliação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plântulas.

Foram utilizadas cerca de 500 sementes de *Cattleya intermedia* por frasco.

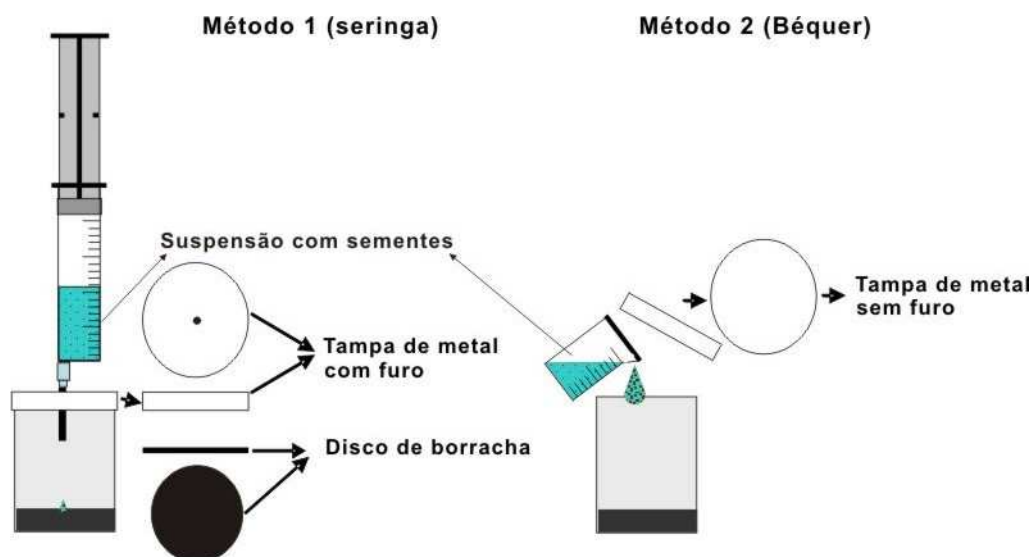


Figura 1. Métodos alternativos de semeio de orquídea com seringa e com béquer *in vitro*, sem a utilização de câmara de fluxo laminar.

Após o semeio, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, com 16/8 h luz/escuro e irradiância de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A análise de variância foi realizada com auxílio do programa SAEG 9.0, ajustando-se as equações de regressão para as variáveis: número de sementes germinadas aos dois meses, número, altura média e produção de matéria fresca de plântulas aos 8 meses, como variáveis dependentes da concentração de NaClO dentro dos dois métodos de semeadura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em média, quando se compara CFL (controle) com uso de seringa ou de béquer, a germinação e o crescimento das plantas foi semelhante, exceto para altura de plantas que foram maiores para as semeadas em CFL. Houve maior produção de matéria fresca das plântulas quando obtidas pela semeadura segundo o método 2 (béquer). Nesse método não

havia a presença do furo na tampa e a perda de água por evaporação foi menor do que aquela ocorrida nos frascos do método 1 (seringa), onde tal perda ocorreu (observação visual). A germinação e a produção de matéria fresca de tecidos foram superiores para as menores concentrações de hipoclorito (NaClO) em relação ao tratamento controle, sem a aplicação deste desinfestante sobre o meio (Figura 2 e Quadro 1).

Ocorreram diferenças morfológicas entre as plantas semeadas em condições de câmara de fluxo, tratamento controle, apresentando estas a formação de inúmeros calos. Nos tratamentos utilizando NaClO houve baixa formação de calos, com plântulas apresentando folhas e raízes bem diferenciadas (Figura 3).

Não ocorreram contaminações em nenhum dos tratamentos com NaClO . Em trabalhos com outras espécies, resultados semelhantes foram encontrados, indicando baixa taxa de contaminação e alta taxa de sobrevivência e germinação das sementes. Yanagawa (1995, 2003), trabalhando em condições não estéril com *Cattleya loddigessi*, *Bletilla striata*, *Dendrobium* spp. e *Phalaenopsis* spp., observaram que 100 % das sementes dessas plantas germinaram quando uma solução de NaClO (60 mg L^{-1}) foi borrifada sobre as mesmas no meio de cultura. Nesses trabalhos, foram utilizadas concentrações entre 60 e 6.000 mg L^{-1} de NaClO , sendo que 10 % das sementes de *Cattleya loddigessi* não germinaram quando a solução de hipoclorito apresentava concentração de 6.000 mg L^{-1} .

Em *Cypripedium macranthos*, a germinação foi estimulada por uma solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 3,2 % (32 g L^{-1}); além disso, o tempo de tratamento influenciou fortemente os resultados. Quando as sementes permaneceram por 7 min na presença de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ apenas 9 % das sementes germinaram depois de três meses; por outro lado, com 7 h houve germinação de 46 e 65 % das sementes no primeiro e no terceiro mês, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados para NaClO a 6.000 mg L^{-1} , em que as sementes tratadas por 1 h nessa solução apresentaram 70 % de

germinação. Em tempos maiores de exposição ao NaClO houve decréscimo da germinação (Miyoshi & Mii, 1998).

O efeito benéfico da desinfestação na germinação de sementes e no crescimento de plântulas é relatado para outras espécies tanto em condições *in vitro* como *ex vitro*. A desinfestação (*ex vitro*) de sementes de *Juncus effusus* L. com uma solução de NaClO a 52,5 g L⁻¹ seguido do plantio em solo promoveu 100 % de germinação, já em condições de não-desinfestação a germinação foi de 80 % (Ervin & Wetzell, 2002). Em arroz, sementes desinfestadas com NaClO apresentaram maior produção de matéria seca pelas plântulas formadas em relação àquelas desinfestadas com HgCl₂ ou não desinfestadas. Plântulas oriundas de sementes esterilizadas com NaClO produziram 4,2 g/frasco de matéria seca, esterilizadas com HgCl₂ produziram 2,8 g e as sementes não esterilizadas 2,3 g/frasco. Nesse trabalho, os autores verificaram que o NaClO apresentava efeito benéfico em acréscimo ao da descontaminação das sementes. Para comprovar isso descontaminaram as sementes primeiramente com HgCl₂ e, posteriormente, com uma solução de NaClO, constatando que mesmo em sementes previamente esterilizadas/descontaminadas houve incremento de produção na matéria seca das plântulas de arroz (Chun et al., 1997).

Na clonagem de *Eucalyptus pellita*, a utilização de meios desinfestados quimicamente com soluções de NaClO em concentrações variando entre 0,24 e 108 mg L⁻¹ apresentaram resultados satisfatórios quanto ao alongamento dos explantes em relação ao cultivo em meio autoclavado. O número de ramos produzidos foi negativamente alterado, porém os autores consideram que tal fato é compensado pelo ganho em comprimento na presença NaClO no meio (Teixeira et al., 2008).

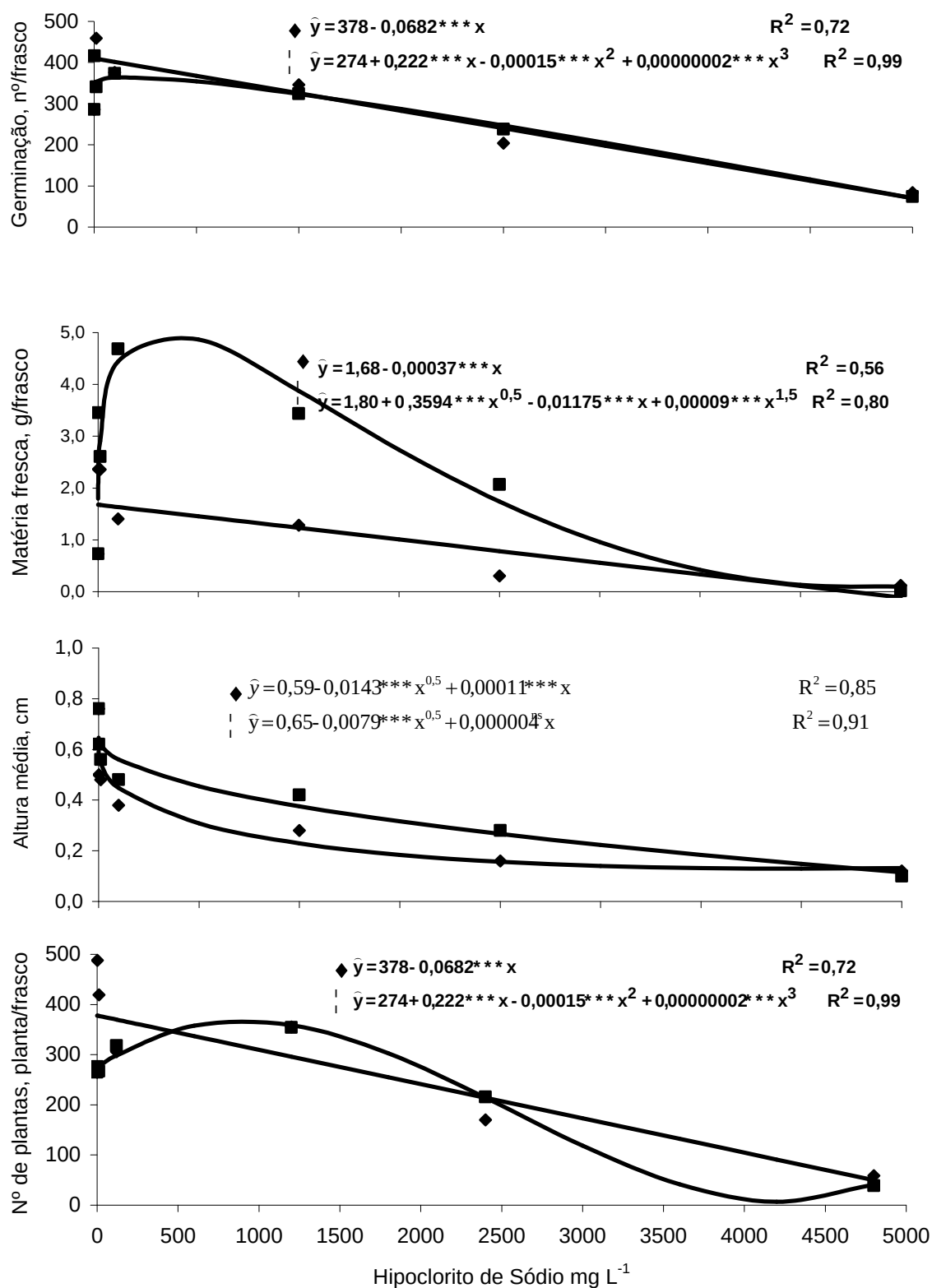


Figura 2. Germinação aos dois meses e produção de matéria fresca de tecidos, altura média e número de plântulas de *Cattleya intermedia*, aos oito meses de idade, em resposta a concentrações de hipoclorito de sódio (Método 1 seringa (♦) e Método 2 béquer (◻)).

Quadro 1. Análise de variância para germinação aos dois meses (G60) e para produção de Matéria Fresca de Plântulas (MFP), Altura Média de Plântulas (AMP) e Número de Plântulas (NP) aos oito meses de idade

FV	GL	QM			
		G60	MFP	AMP	NP
		Plântulas/frasco	g/frasco	cm	Plântulas/frasco
Repetições	4	306	0,350	0,0098 ^o	2196
CFL vs Ser. + Béq.	1	248	0,409	0,0395***	2003
Seringa. vs Béquer	1	82238***	127,150***	0,5210***	191412***
D d/ Seringa	5	108744***	4,107***	0,2457***	107357***
D d/ Béquer	5	63239***	13,352***	0,2413***	51929***
Residuo	48	672	0,202	0,0042	1217
CV (%)		9,72	25,21	16,38	12,98

^o, *** Significativo a 10 e a 0,1 %.

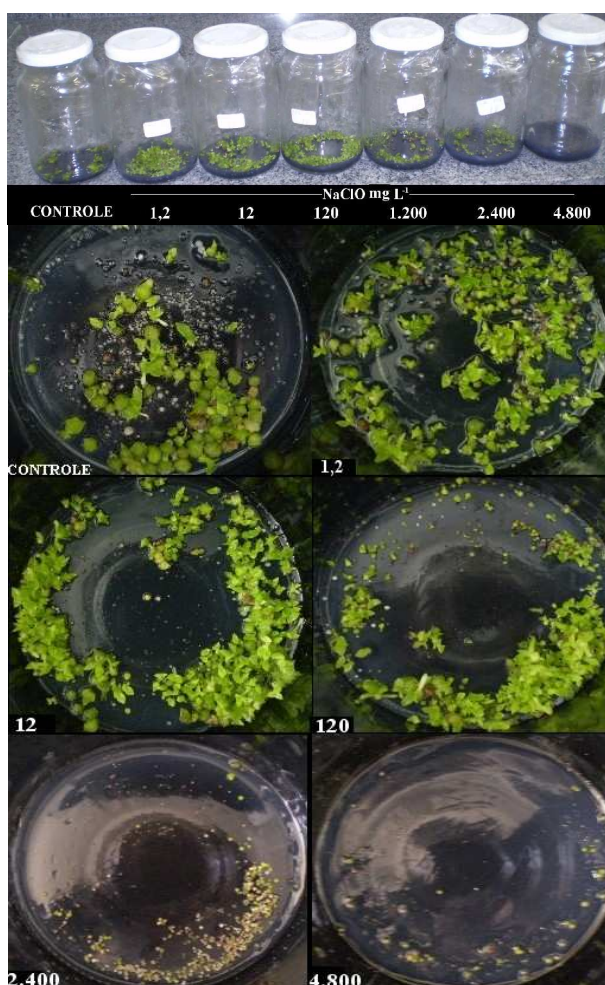


Figura 3. Germinação e crescimento de sementes de *Cattleya intermedia* em resposta às concentrações de hipoclorito de sódio (mg L^{-1}), com a inoculação de sementes via béquer (Método 2 – Figura 1).

CONCLUSÕES

1. Não houve contaminação do meio de cultura com aplicação de hipoclorito de sódio – NaClO em concentrações variando de 1,2 a 4.800 mg L⁻¹.
2. O NaClO exerceu efeito benéfico sobre a germinação e a produção de matéria fresca e número de plantas em relação à sua não utilização direta no meio de cultivo.
3. A técnica da seringa pode ser substituída pela técnica béquer, dada sua maior eficiência e simplicidade operacional.
4. É possível a germinação de orquídeas pela desinfestação química sem o uso de câmara de fluxo laminar e em condições não esterilizadas previamente.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G. & NUNES, V.F. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*, 24: 217-220, 2006.
- CHUN, S.C.; SCHNEIDER, R.W. & COHN, M.A. Sodium hypochlorite: Effect of solution pH on rice seed disinfestation and its direct effect on seedling growth. *Plant Disease*, 81:821-824, 1997.
- ERVIN, G.N. & WETZEL, R.G. Effects of sodium hypochlorite sterilization and dry cold storage on germination of *Juncus effusus* L. *Wetlands*, 22:191-195, 2002.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158, 1968.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.*, 73:1-25, 1922.
- MEAD, J.W. & BULARD, C. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. *New Phytol.*, 74:33-40, 1975.

- MIYOSHI, K. & MII, M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 102:481-486, 1998.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497, 1962.
- NOVAIS, R.F. & RODRIGUES, D.T. Nutrição e Fertilização de Orquídeas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 2004, Viçosa. Simpósios, Palestras e Mesas Redondas. Sociedade Botânica do Brasil, 2004.
- PEDROZA, J. & MICAN, Y. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* rchb.f. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 42:543-547, 2006.
- RASMUSSEN, H.N. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza *Physiol. Plant.*, 86:161-167, 1992.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M. & TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. *Ciência Florestal*, 18:185-191, 2008.
- VEJSADOVÁ, H. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro* *Acta Biologica Cracoviensia-Series Botanica*, 48:109-113, 2006.
- YANAGAWA, T.; NAGAI, M.; OGINO, T. & MAEGUCHI, R. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a mean to prevent *in vitro* contamination. *Lindleyana*, 10:33-36, 1995.
- YANAGAWA, T.; YAMAMOTO, E. & MAEGUCHI, R. A simple micropropagation system using plastic vessels by direct application of disinfectants for orchids *Proceedings of NIOC 2003*, Nagoya, Japan., 15-18, 2003.

CAPÍTULO 2

USO DE DESINFESTANTES QUÍMICOS NA MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Arundina* *bambusifolia* E *Epidendrum ibaguenses*

RESUMO

A redução de custos na propagação de plantas é de grande importância para a produção econômica de mudas. Na micropropagação *in vitro* convencional, a necessidade de equipamentos de alto custo e mão de obra especializada onera a produção, o que resulta em mudas de elevado custo. O uso de agentes químicos para descontaminação no cultivo *in vitro* tem sido estudado, demonstrando que este método é eficiente no controle de microrganismos, é de baixo custo e de fácil execução. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da aplicação de hipoclorito de sódio (NaClO) para a descontaminação no processo de inoculação de explantes de orquídea das espécies *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses* no meio de cultivo *in vitro*, na presença ou ausência de carvão ativado. Os tratamentos foram estabelecidos segundo o fatorial (2 x 5) + 1, com cinco repetições e distribuídos em blocos casualizados, sendo ausência ou presença de carvão ativado e cinco concentrações de NaClO, em comparação ao convencional (controle) com a utilização de câmara de fluxo laminar (CFL), sem a aplicação de NaClO aos meios nos frascos. Foram utilizadas soluções de NaClO em cinco concentrações: 1.200; 2.400; 3.600; 4.800 e 6.000 mg L⁻¹ (equivalentes a 50; 100; 150; 200 e 250 mL L⁻¹ de água sanitária comercial - ASC) borrifadas sobre explantes e meio de cultura, na ausência ou presença de carvão ativado. Os explantes utilizados foram segmentos nodais de plantas adultas cultivadas a campo. Todos os procedimentos para inoculação dos explantes foram

realizados fora da CFL, exceto para o tratamento controle (meio autoclavado e inoculação dos explantes em condições de CFL). A presença de carvão ativado promoveu, em média, as melhores respostas para produção de matéria fresca, altura e números de brotações. Por outro lado, a contaminação dos frascos foi maior na presença do carvão ativado. A resposta máxima de produção de matéria fresca, altura e o número de brotações foi obtida quando se utilizaram 1.200 mg L^{-1} de NaClO (equivalente a 50 mL L^{-1} de ASC) na presença de carvão ativado no meio de cultura, correspondente à matéria fresca de 1,10 e 0,16 g/frasco para *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses*, respectivamente. No tratamento controle, onde todo o procedimento foi realizado em condições de CFL, houve contaminação generalizada de todos os tecidos em todas as repetições, impedindo o crescimento dos tecidos das duas espécies.

Palavras chave: cultura de tecido, contaminação, água sanitária, orquídea.

CHEMICAL USE OF DISINFECTANTS IN *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF *Arundina bambusifolia* AND *Epidendrum ibaguensis*

SUMMARY

A cost reduction in plant propagation is of great importance for an economic production of orchid seedlings. In conventional *in vitro* micropropagation, the need for costly equipment and skilled labor boosts the production costs, resulting in very expensive seedlings. The use of chemical agents for decontamination in *in vitro* culture has been studied, demonstrating that this method is effective in controlling microorganisms, inexpensive and easy to accomplish. The aim of this study was to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite (NaClO) application for decontamination in the process of explant inoculation of the orchid

species *Arundina bambusifolia* and *Epidendrum ibaguenses* in the culture medium *in vitro* in the presence or absence of activated carbon. The treatments were arranged in a factorial design $(2 \times 5) + 1$ with five replications and distributed in randomized blocks, with the absence or presence of activated carbon and NaClO concentrations. These were compared with the conventional treatment (control), with the use of laminar flow (LF), without NaClO application to the medium jars. NaClO solution was used in five concentrations: 1,200, 2,400, 3,600, 4,800, and 6,000 mg L⁻¹ (equivalent to 50, 100, 150, 200, and 250 mL L⁻¹ commercial bleach - CB) sprayed onto the explants and culture media in the absence or presence of activated carbon. The explants used were nodal segments of field-grown adult plants. All procedures for explant inoculation were carried out outside the laminar flow chamber, except for the control treatment (autoclaved medium and explant inoculation under LF). In the presence of activated carbon, the mean results for fresh weight yield, height and number of shoots were best. On the other hand, the jars were more contaminated in the presence of activated carbon. The maximum response of fresh weight yield, height and number of shoots was obtained with 1,200 mg L⁻¹ NaCl (equivalent to 50 mL L⁻¹ CB) in the presence of activated carbon in the culture medium, corresponding to a fresh weight of 1.10 and 0.16 g/jar of *Arundina bambusifolia* and *Epidendrum ibaguensis* respectively. In the control treatment, where the entire procedure was conducted under LF, there was general contamination of all tissues in all replications, impairing tissue growth in both species.

Key words: tissue culture, contamination, chlorine bleach, orchid.

INTRODUÇÃO

A produção de mudas por cultura de tecidos de orquídeas tem merecido interesse crescente no meio orquidófilo, no sentido de

multiplicar os melhores genótipos entre as progênes de diversos cruzamentos e, de modo particular, aumentar a disponibilidade das melhores espécies e variedades de plantas nativas, algumas em extinção, tornando-as acessíveis a baixos custos.

Para esse cultivo, a necessidade de métodos sofisticados, exigentes quanto a condições de laboratório, com elevados custos operacionais, e a necessidade de mão de obra qualificada, torna esta técnica inacessível para a grande maioria daqueles que cultivam orquídeas. Tentativas de simplificar esses métodos, tornando-o factível em ambiente caseiro e à mão de obra não especializada, tem sido objetivo de muitos pesquisadores. A avaliação da essencialidade de autoclave e câmara de fluxo laminar (CFL) torna-se, assim, ponto crucial.

Trabalhos com NaClO demonstram claramente que sua aplicação na forma de soluções diluídas, em muitos casos, promove melhor crescimento dos tecidos *in vitro*, como, por exemplo: germinação de sementes de arroz e de orquídeas, e multiplicação de clones de *Eucalyptus* (Chun et al., 1997; Ervin & Wetzel, 2002; Teixeira et al., 2008).

No cultivo *in vitro* de *Lilium longiflorum*, submetido à desinfestação química do meio com a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), houve intenso crescimento de explantes, com melhor resultado na maior dose de H_2O_2 $0,2\text{ g L}^{-1}$ (0,02 %), comparativamente ao meio controle (autoclavado, sem a adição deste desinfestante ao meio). No entanto, nessa condição (H_2O_2) a contaminação do meio foi alta, em cerca de 40 % dos frascos (Curveto et al., 2006).

Teixeira et al. (2006) utilizaram baixas doses de NaClO (1, 3, 5, 7 e 9 mg L^{-1}) adicionadas aos meios de cultura para banana, para o controle de contaminação. No tratamento controle (autoclavado), houve contaminação em 25 % dos frascos, e apenas 10 % dos frascos cultivados em meio contendo 1 mg L^{-1} de NaClO. Nas doses mais elevadas não houve contaminação e os tecidos apresentaram-se sem injúria química. A esterilização do meio de cultura utilizando NaClO dobrou a produção de

matéria fresca (76 mg/frasco) comparativamente ao meio autoclavado (32 mg/frasco), não ocorrendo diferenças significativas entre as concentrações de NaClO.

No cultivo *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L., utilizando meios desinfestados quimicamente com NaClO, em concentrações superiores a 5 mg L⁻¹, não ocorreu contaminação nos frascos de cultivo. Para concentrações maiores que 90 mg L⁻¹ de NaClO houve alta redução na ramificação dos explantes, mas promoveu considerável alongamento dos explantes (Teixeira et al., 2008).

A aplicação de soluções desinfestantes com diferentes concentrações de NaClO ou H₂O₂ na forma de spray sobre sementes de *Bletilla striata*, *Cattleya loddigessi*, *Dendrobium kingianum*, *Habenaria radiata* e *Phalaenopsis* ssp. promoveu 100 % de germinação mesmo em concentrações altas de hipoclorito, 5.000 mg L⁻¹ de Cl ativo, não ocorrendo mortalidade das sementes e, ou, contaminação do meio. Resultados semelhantes foram obtidos em explantes repicados com uso dessas soluções na forma de spray, sem perda de crescimento das plântulas. Para H₂O₂ as respostas foram semelhantes quando se utilizou concentração de 0,1 g L⁻¹ (0,01 %), tanto no meio de cultivo quanto na solução aplicada como spray (Yanagawa et al., 1995).

Hipoclorito de sódio e Ca(ClO)₂ são comumente utilizados na desinfestação de explantes cultivados *in vitro*. Para maçã, houve melhor controle da contaminação com o NaClO, porém a oxidação dos explantes foi maior comparativamente ao Ca(ClO)₂. Nesse mesmo ensaio, não houve resposta significativa dos explantes ao ácido ascórbico como agente antioxidante (Erig et al., 2003).

Quanto à utilização de carvão ativado no meio de cultivo, sabe-se que ele apresenta grande superfície específica com elevada capacidade de adsorção de inúmeros compostos tóxicos para o cultivo *in vitro* como, por exemplo, os fenóis exsudados durante o cultivo *in vitro* e o etileno

produzido e acumulado em excesso no interior dos frascos de cultivo (Thomas, 2008).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de explantes inoculados em meios de cultura em condições não-estéreis, sem autoclavagem prévia, utilizando-se soluções de NaClO em concentrações crescentes borrifadas sobre os explantes no meio de cultura, na ausência ou presença de carvão ativado.

MATERIAL E MÉTODOS

Para preparo do meio de cultura foram utilizados os sais do meio Gamborg 5 – GB5 (Gamborg et al., 1968), acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 100 mL L⁻¹ de água de coco verde e pH ajustado em 5,5. Foram distribuídos 25 mL de meio em cada frasco de cultivo, posteriormente autoclavados a 121 °C por 20 min.

A unidade experimental foi um frasco com 234 mL de capacidade, contendo 25 mL de meio GB₅ (Gamborg et al., 1968) com três segmentos nodais de *Arundina bambusifolia* ou *Epidendrum ibaguenses*. O ensaio foi composto por um fatorial (2 x 5) + 1: sendo ausência ou presença de carvão ativado, cinco concentrações de NaClO: 1.200; 2.400; 3.600; 4.800 e 6.000 mg L⁻¹, na forma de água sanitária comercial (ASC), utilizando alíquotas de ASC correspondentes a 50; 100; 150; 200 e 250 mL L⁻¹, mais um tratamento controle. Foram utilizadas cinco repetições, em blocos casualizados.

Nos tratamentos com NaClO, todos os procedimentos foram realizados fora da CFL. Em cada tratamento, foi aplicado 1 mL da respectiva solução desinfestante, via spray, sobre o meio já geleificado (frio) e com os explantes. Para o tratamento controle foi utilizado o método tradicional de micropropagação, com todos os procedimentos realizados em CFL, e sem a utilização da NaClO.

O material vegetal utilizado foram segmentos nodais retirados de plantas de *Arundina bambusifolia*, obtidas em touceira cultivada em uma residência na cidade de Ouro Preto e segmentos nodais de brotos aéreos de *Epidendrum ibaguenses*, cultivados no setor de floricultura da Universidade Federal de Viçosa. Após a coleta, o material foi lavado com detergente neutro em água corrente, fazendo-se a limpeza do mesmo. Posteriormente, o material vegetal foi submerso em: álcool 70 % durante 1 min; após descarte do álcool, em água sanitária comercial (24 mL L⁻¹) por 15 min e enxaguados com água autoclavada. Para o tratamento controle os procedimentos realizados a partir da imersão em álcool foram realizados no interior da CFL.

Para este ensaio, todos os frascos com meio foram autoclavados a 121 °C durante 20 min; não houve adição de agentes químicos para desinfestação ao meio nesta fase. Após a aplicação dos tratamentos com NaClO e inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, com 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 µmol m⁻² s⁻¹.

A avaliação do ensaio foi feita considerando-se: oxidação dos explantes, contaminação por bactérias e, ou, fungos, e crescimento e desenvolvimento dos tecidos.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ajuste de regressão das variáveis estudadas de acordo com os tratamentos (concentrações de NaClO dentro de sem ou com carvão ativado), utilizando-se o programa SAEG e 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis de crescimento e desenvolvimento avaliadas para *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses* demonstraram que a presença de carvão ativado promoveu os melhores resultados. A produção de matéria

fresca, comprimento e número de brotos foram, em média, maiores na presença do carvão ativado. A produção média de matéria fresca de *Arundina* e *Epidendrum*, em média para doses de NaClO, foi de 0,021 e 0,064 g/frasco na ausência de carvão ativado e 1,101 e 0,161 g/frasco na sua presença, respectivamente. Os maiores comprimentos de brotos também ocorreram na presença de carvão ativado para ambas as espécies: 4,544 e 1,496 cm para *Arundina* e *Epidendrum*, respectivamente. O número de brotações laterais foi, em média, de 1,2 e 1,1 broto/frasco, na ausência de carvão e de 4,4 e 1,6 brotos/frasco, na presença de carvão ativado para *Arundina* e *Epidendrum*, respectivamente (Figuras 1 e 2).

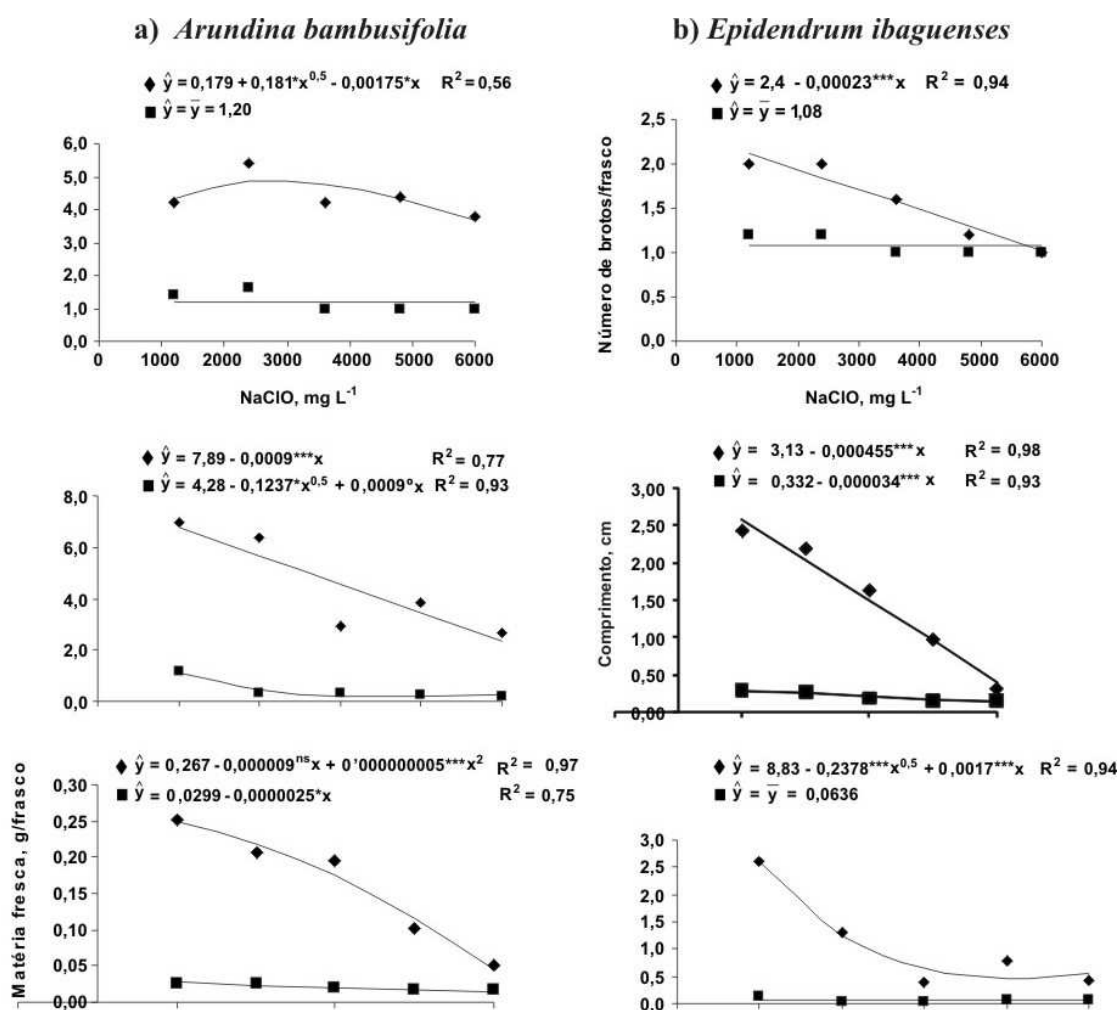


Figura 1. Resposta de (a) *Arundina bambusifolia* e (b) *Epidendrum ibaguenses* a soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) aplicadas via spray, na ausência (○) ou presença (◆) de carvão ativado.

A contaminação por fungos foi semelhante, em média, no controle (CFL) e nos tratamentos com NaClO, enquanto a contaminação por bactérias ocorreu de forma generalizada no tratamento controle (com a utilização de capela de fluxo laminar e sem a adição de NaClO ao frasco) para as duas espécies, impossibilitando o crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Quadros 1 e 2). Para os tratamentos com NaClO, houve baixa contaminação do meio. Por outro lado, no tratamento-controle foram encontradas, em média, cinco colônias/frasco de bactérias para ambas as espécies e de fungos unicamente em frascos com Arundina. Na presença de carvão ativado houve maior contaminação, possivelmente pela adsorção de parte do Cl nessa condição, reduzindo o efeito do NaClO sobre os microrganismos presentes no explante. Por outro lado, a presença de carvão ativado no meio de cultura reduz o efeito de fenóis liberados pelos tecidos vegetais *in vitro* que, em alguns casos, causam a morte do explante em poucas horas. Em sorgo, a presença de 1 a 5 g L⁻¹ de carvão ativado foi suficiente para controle da oxidação dos tecidos que provocava a morte de todos os explantes inoculados na ausência de carvão ativado (Nguyen et al., 2007).

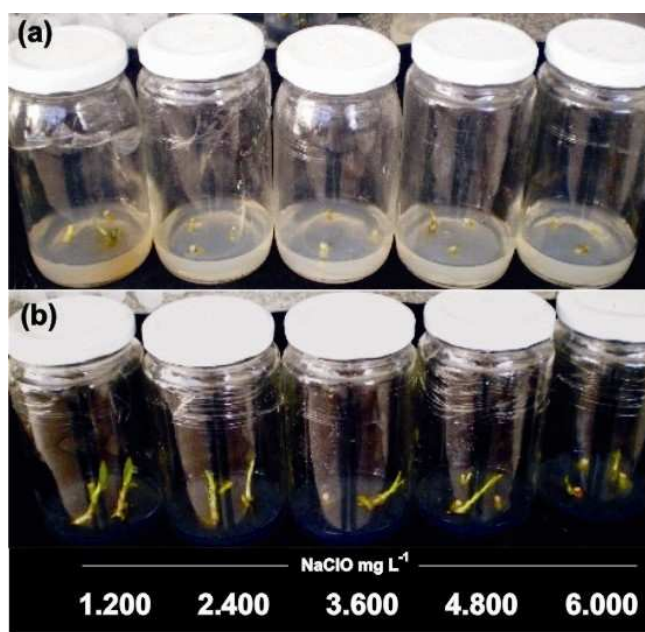


Figura 2. Resposta de *Arundina bambusifolia* a soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) aplicadas via spray na ausência (a) ou presença (b) de carvão ativado, aos 60 dias de idade.

O aumento da concentração de NaClO utilizada na forma de spray causou redução, para ambas as espécies, da produção de matéria fresca, comprimento e número de brotos (Figura 1 e Quadro 2).

Trabalhos com NaClO demonstram que sua aplicação na forma de soluções diluídas, em muitos casos, promove melhor crescimento de tecidos *in vitro* de diferentes espécies de plantas (Chun et al., 1997; Ervin & Wetzal, 2002; Teixeira et al., 2008).

Porém, neste trabalho, doses crescentes de NaClO foram deletérias, certamente devido à toxidez causada por este desinfestante com o aumento de sua concentração (Figura 1). Por outro lado, a menor concentração de NaClO foi eficiente para o controle da contaminação microbiana e possibilitou o crescimento dos explantes, o que não ocorreu no tratamento controle, realizado em condições de CFL e sem a aplicação de NaClO na forma de spray (Figura 1).

Quadro 1. Contaminação por fungos e bactérias, em frascos com tecidos de *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses*, em resposta a doses de hipoclorito (NaClO) na ausência ou presença de carvão ativado no meio de cultivo *in vitro*

NaClO	Carvão ativado	<i>Arundina bambusifolia</i>		<i>Epidendrum ibaguenses</i>	
		Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria
mg L ⁻¹	g L ⁻¹	-----colônias/frascos (%)-----			
0 ⁽¹⁾	2,0 ⁽¹⁾	1,0 (20)	5,0 (100)	0 (0)	5 (100)
1.200	0,0	1,0 (20)	0,0 (0)	0 (0)	1 (20)
2.400	0,0	0,0 (0)	0,0 (0)	0 (0)	1 (20)
3.600	0,0	1,0 (20)	0,0 (0)	0 (0)	1 (20)
4.800	0,0	0,0 (0)	1,0 (20)	0 (0)	1 (20)
6.000	0,0	0,0 (0)	0,0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.200	2,0	3,0 (60)	3,0 (60)	2 (40)	1 (20)
2.400	2,0	0,0 (0)	3,0 (60)	0 (0)	1 (20)
3.600	2,0	0,0 (0)	1,0 (20)	0 (0)	0 (0)
4.800	2,0	0,0 (0)	1,0 (20)	0 (0)	1 (20)
6.000	2,0	0,0 (0)	1,0 (20)	0 (0)	0 (0)

⁽¹⁾ Tratamento controle.

Quadro 2. Análise de variância para contaminação por fungos e bactérias, número de brotos (NB), Comprimento de brotos (CB) e produção de matéria fresca (MFB) para *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses* em resposta a doses de hipoclorito (NaClO) na ausência ou presença de carvão ativado no meio de cultivo *in vitro*

FV	GL	QM				
		Fungo	Bactéria	NB	CB	MFB
<i>Arundina bambusifolia</i>						
Repetições	4	2,727	3,409	0,3636	0,3243	0,00008
CFL vs NaClO	1	1,136	72,727***	35,636***	28,3183***	0,03767***
S/carv.vs C/carv.	1	0,500	32,000***	128,0000***	209,7152***	0,24612***
DAS d/S/carv.	4	1,500	1,000	0,4000	0,7976	0,00013
DAS d/C/carv	4	9,000**	6,000	1,8000**	20,0114***	0,03423***
Resíduo	40	1,977	3,159	0,3936	0,2223	0,00011
CV (%)		257,82	130,34	24,65	20,78	12,70
<i>Epidendrum ibaguenses</i>						
Repetições	4	0,682	0,682	0,1091	0,0120	0,01903
CFL vs NaClO	1	0,182	84,045***	7,9200***	3,3058***	1,54188***
S/carv.vs C/carv.	1	2,000 ^o	0,500	2,8800***	20,6853***	13,45663***
DAS d/S/carv.	4	0,000	1,000	0,0600	0,0224	0,00574
DAS d/C/carv	4	4,000***	1,500	1,0400***	3,8184***	4,29108***
Resíduo	40	0,682	3,432	0,0791	0,0154	0,01928
CV (%)		454,15	169,81	23,44	15,98	26,23

^o, *, ** e *** significativo a 10, 5, 1 e 0,1 %.

CONCLUSÕES

1. A pulverização de soluções de NaClO sobre o meio de cultura já inoculado com o explante (segmento nodal) promoveu o controle da contaminação.

2. Doses crescentes de NaClO promoveram redução do crescimento das plantas.

3. A propagação vegetativa *in vitro* de *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses* pode ser realizada por meio de desinfestação química com rendimento superior ao método tradicional de cultivo.

4. O uso de carvão ativado promoveu os melhores resultados em termos de produção de matéria fresca, comprimento de plantas e número de brotações; todavia, a contaminação com bactérias e fungos é maior na sua presença.

LITERATURA CITADA

- CHUN, S.C.; SCHNEIDER, R.W. & COHN, M.A. Sodium hypochlorite: Effect of solution pH on rice seed disinfestation and its direct effect on seedling growth. *Plant Dis.*, 81:821-824, 1997.
- CURVETTO, N. MARINANGELI, P. & MOCKEL, G. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology. *Biocell*, 30:497-500, 2006.
- ERIG, A.C. & SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala R. *Bras. Agroci.*, 9:221-227, 2003.
- ERVIN, G.N. & WETZEL, R.G. Effects of sodium hypochlorite sterilization and dry cold storage on germination of *Juncus effusus* L. *Wetlands*, 22:191-195, 2002.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158, 1968.
- NGUYEN, T.V.; THU, T.T.; CLAEYS, M. & ANGENON, G. *Agrobacterium* mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 91:155-64, 2007.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M. & TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 86:375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M. & TEIXEIRA, M.T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. *Ciência Florestal*, 18:185-191, 2008.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotech. Adv., 26:618-631, 2008.

YANAGAWA, T.; NAGAI, M.; OGINO, T. & MAEGUCHI, R. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a mean to prevent *in vitro* contamination. Lindleyana, 10:33-36, 1995.

CAPÍTULO 3

PROPAGAÇÃO DE *Phalaenopsis* spp. E *Dendrobium nobile* EM DIFERENTES MEIOS, UTILIZANDO-SE SERINGAS DESCARTÁVEIS

RESUMO

A propagação vegetativa *in vitro* é, por muitas vezes, impossibilitada pela alta contaminação de meios de cultura e explantes, além de necessitar de equipamentos sofisticados e mão de obra especializada para execução de todo o processo. O uso de técnicas que tornem mais simples e acessível a propagação vegetativa é de grande interesse econômico, reduzindo os custos de produção e, conseqüentemente, o valor final da planta propagada. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar o uso de seringa descartável, em substituição à câmara de fluxo laminar (CFL), e duas concentrações de reguladores de crescimento, no cultivo de tecidos de plantas de orquídeas. Segmentos nodais de hastes florais de plantas de *Phalaenopsis* spp. e discos delgados de segmentos nodais do caule mais jovem de plantas de *Dendrobium nobile* foram inoculados em 5 mL de meios de cultura sólidos em seringas descartáveis de 20 mL, sem a utilização de CFL. Com cada espécie foi realizado ensaio em que foram testados três meios (MS1/2, GB5 e VW), três reguladores de crescimento (TDZ, ANA e BAP) em duas doses de cada regulador de crescimento (1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e um tratamento controle (MS1/2 com 1,0 mg L⁻¹ de TDZ em tubos de ensaio com os explantes manipulados em condições de CFL). Os tratamentos, segundo o fatorial (3 x 3 x 2) + 1, foram conduzidos em blocos ao acaso, com cinco repetições. Os explantes foram inicialmente desinfestados em álcool etílico 70 % por 30 s e depois com hipoclorito de sódio (NaClO) a 24 mg L⁻¹ equivalente a 1 mL L⁻¹ de água sanitária comercial (ASC), por

15 min. Os segmentos nodais foram, então, inoculados nas seringas e o conjunto novamente desinfestado pela sucção de NaClO a 24 mg L⁻¹ e agitado por 5 min, descartando-se, então, esta solução da seringa. As seringas e o tratamento-controle (em tubo de ensaio) foram mantidos em câmara de crescimento, a 27 ± 2 °C com 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 µmol m⁻² s⁻¹. De modo geral, as diferenças entre as variáveis medidas (matéria fresca, comprimento de folhas, número de plantas, número e comprimento de raízes) de ambos os gêneros mostraram-se pouco sensíveis aos tratamentos (meios e reguladores de crescimento) com poucos efeitos significativos, de modo particular para o *Dendrobium nobile*. O uso do meio de cultura em seringa descartável mostrou-se adequado à propagação vegetativa dos dois gêneros de orquídea, evitando a contaminação dos tecidos e meio de cultivo.

Palavras chave: cultura de tecido, contaminação, água sanitária, regulador de crescimento, orquídea.

PROPAGATION OF *Phalaenopsis* spp. AND *Dendrobium nobile* IN DIFFERENT MEDIA, USING DISPOSABLE SYRINGES

SUMMARY

The vegetative propagation *in vitro* of orchids is often impeded by the high contamination degree of culture media and explants, aside from the requirements for sophisticated equipment and skilled labor to perform the entire process. The use of technologies that simplify vegetative propagation and make it more accessible is of great economic interest, reducing production costs and thus cheapening the final value of the propagated plant. The objective of this study was to test the use of disposable syringes, to substitute for the laminar flow (LF) chamber, and two concentrations of growth regulators in tissue culture of orchid plants.

Nodal segments of flower stalks of *Phalaenopsis* spp. plants and thin disks of nodes of the youngest stem of *Dendrobium nobile* plants were inoculated in 5 mL of solid culture media in 20 mL disposable syringes without the use of LF. A separate trial was conducted for each species, testing three media (MS1/2, GB5 and VW), three growth regulators (TDZ, NAA and BAP) in two doses of each growth regulator (1.0 and 2.0 mg L⁻¹), and a control (MS1/2 with 1.0 mg L⁻¹ TDZ in test tubes and explants treated under LF). The treatments in a factorial design (3 x 3 x 2) + 1 were conducted in blocks with five replications. The explants were initially disinfected with 70 % ethanol for 30 s and then with 24 mg L⁻¹ sodium hypochlorite (NaClO), equivalent to 1 mL L⁻¹ commercial bleach (CB) for 15 min. The nodal segments were then inoculated in the syringes and everything disinfected again by suction of 24 mg L⁻¹ NaClO and shaking for 5 min, to then discard this solution from the syringe. The syringes and the control treatment (test tube) were maintained in a growth chamber at 27 ± 2 °C with 16/8 h light / dark and irradiance of 48 mol m⁻² s⁻¹. In general, the measured variables (fresh weight, leaf length, number of plants, root number and length) of both genera did not differ in the treatments (media and growth regulators) with little significant effects in particular for *Dendrobium nobile*. The use of culture medium in disposable syringes was suitable for vegetative propagation of the two orchid genera, avoiding contamination of tissue and culture medium.

Key words: tissue culture, contamination, chlorine bleach, growth regulator, orchid.

INTRODUÇÃO

A produção de mudas de orquídeas em escala comercial passa pela propagação seminífera e, ou, clonal via cultura de tecidos. A primeira tem como vantagem a obtenção de novas plantas com toda a variação genética

própria do procedimento, enquanto a cultura de tecidos permite a obtenção de grande número de plantas geneticamente idênticas, escolhidas entre as melhores de toda a diversidade das progênies obtidas pelo primeiro método de propagação.

Embora procedimentos de germinação em orquídeas sejam bastante simples, de domínio da maioria dos orquidófilos, a propagação via cultura de tecidos é tecnicamente bem mais difícil, com a exigência de complexa estrutura laboratorial e conhecimento técnico das pessoas envolvidas.

A procura de meios para simplificar a cultura de tecidos de orquídeas, tornando-a factível àqueles que cultivam esta planta, tem sido uma tônica de um grupo de pesquisa da Universidade Federal de Viçosa envolvido com o cultivo e pesquisa destas plantas. Assim, a procura por meios que possam dispensar o uso de autoclave e de câmara de fluxo laminar (CFL) de modo a diminuir os custos de laboratório e sua complexidade técnica é um objetivo constante desse grupo.

Nesta linha de pesquisa outra preocupação diz respeito aos meios de cultura, com ênfase, também, à necessidade de reguladores de crescimento e suas concentrações.

Quatro variedades de *Phalaenopsis* submetidas à propagação *in vitro* apresentaram resposta altamente significativa à adição de BAP e ANA ao meio de cultivo. Os melhores resultados foram obtidos com explantes foliares cultivados em meio contendo 88,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP e 5,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA. Nessa condição, foram produzidos de 10 a 13 protocórmios por explante em 12 semanas. Nesse mesmo ensaio, o uso de Hyponex^{®(1)} (1 g L⁻¹ do fertilizante NPK 6,5-4,5-19 + 2 g L⁻¹ do 20-20-20) como fonte de nutrientes promoveu resultados semelhantes ao obtido com o uso do meio MS (Park et al., 2002a).

A embriogenese somática é uma ferramenta importante para a multiplicação de orquídeas bem como para a obtenção de plantas transgênicas em *Oncidium*, *Cimbidium*, *Phalaenopsis* e, mais recentemente,

⁽¹⁾ Fertilizante NPK comercial para a adubação de orquídeas e plantas ornamentais em geral.

em *Dendrobium*. Essa última, cultivada *in vitro* sem a adição de hormônios ou na presença de auxinas, apresentou explantes necrosados após 60 dias de cultivo sem a formação de embriões somáticos. Já a adição de citocininas em explantes cultivados sob luz promoveu a formação de embriões em todos os explantes cultivados. No escuro também houve a formação de embriões, mas em número muito inferior em relação a presença de luz. O TDZ ($4,54 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi a citocinina que proporcionou os melhores resultados, com 70 % dos explantes formando embriões somáticos (Chung et al., 2005).

A embriogênese somática em folhas jovens de *Phalaenopsis* ocorreu em 100 % dos casos com o uso de TDZ; por outro lado, a presença de ANA inibiu a formação dos embriões somáticos. Os embriões formados com TDZ foram subcultivados por três vezes durante seis semanas; depois desse período as plantas foram transferidas para casa de vegetação com 100 % de sobrevivência (Chen et al., 2004).

O uso de camadas delgadas de células facilita o cultivo *in vitro*, sendo estas mais responsivas em comparação ao uso de camadas espessas. Em *Doritaenopsis* o uso de camadas finas de células subepidérmicas (1 mm) promoveu a formação de protocórmios em aproximadamente 60 % dos explantes; por outro lado, em camadas mais espessas (5 mm) apenas 10 % dos explantes responderam. O uso de $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ promoveu a formação de protocormios em 72 % dos explantes, o que ocorreu em apenas 22,3 e 1,4 % dos explantes cultivados com BAP ou Zeatina, respectivamente (Park et al., 2002b).

O uso de TDZ ($4,54 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BA ($13,32 \mu\text{mol L}^{-1}$) na regeneração de embriões somáticos em segmentos foliares de *Phalaenopsis* mostrou que ambos apresentam respostas eficientes na indução de calos embriogênicos, porém o primeiro produz maior número de embriões por explante em menor espaço de tempo. Os autores também relataram que a região foliar mais responsiva foi a face adaxial basal, apresentando os melhores resultados comparativamente às demais partes foliares (Kuo et al., 2005).

Puchooa (2004) relata que o melhor meio para cultivo *in vitro* de *Dendrobium* foi o MS, comparativamente aos meios KC e VW. Esse autor menciona também que a adição de 150 mL L⁻¹ de água de coco e 10 g L⁻¹ de extrato de batata ao meio MS promoveram máxima produção de protocórmios, juntamente com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 1 mg L⁻¹ de ANA.

Para a propagação *in vitro* de *Dendrobium malones*, a partir de ápices caulinares ou finas camadas foliares, a adição de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D resultou em alta produção de calos na presença de cinetina (5,0 mg L⁻¹) e AIB (2,0 mg L⁻¹) (Anjum et al., 2006).

O uso de reguladores de crescimento foi essencial para a propagação *in vitro* de *Dendrobium fimbriatum* cultivado em meio KC com 100 mL L⁻¹ de água de coco, 0,5 mg L⁻¹ de niacina, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina e 0,1 mg L⁻¹ de tiamina. Com o uso de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ BAP, a formação de calos em explantes foliares foi máxima (66,7 %) e ocorreu duas semanas após início do experimento. Após a formação dos calos, a multiplicação dos mesmos em meio livre de reguladores de crescimento manteve-se satisfatória por um período de dois anos; juntamente aos calos formados durante este período houve também grande produção de protocórmios sobre os mesmos, os quais geraram grande número de plantas (Roy & Banerjee, 2003).

Grande quantidade de calos em folhas de *Dendrobium formosum* foi obtida com o uso de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, com, também, grande formação de protocórmios. O uso desse regulador permitiu que os explantes comesçassem a se diferenciar a partir do nono dia. A regeneração de plantas foi obtida com BAP e ANA, em que as doses de 2,5 e 1 mg L⁻¹, respectivamente, promoveram melhor crescimento de plantas em altura, número e comprimento de brotos e raízes (Nasiruddin et al., 2003).

Folhas jovens de plantas de *Aerides maculosum* cultivadas em casa de vegetação e *in vitro* foram utilizadas como explantes na propagação *in vitro* desta espécie em meio MS suplementado com ANA, 2,4-D, Cinetina, BAP e água de coco. Para explantes oriundos de plantas *in vivo* não houve

resposta morfogênica e os tecidos se tornaram necrosados. Já explantes de plantas *in vitro* apresentaram desenvolvimento de protocormios sobre as superfícies de ambas as faces após quatro semanas de cultivo. A maior quantidade de embriões por explante (18,2) e a maior frequência de resposta (90 %) foi obtida com 2 mg L⁻¹ de BAP; todavia, a adição de 150 mL L⁻¹ de água de coco também promoveu respostas morfogênicas, com 6,2 embriões/explante e 38,8 % de explantes responsivos (Murthy & Pyati, 2001). Por outro lado, Huan et al. (2004) mostraram que o uso 200 mL L⁻¹ de água de coco no meio de cultivo para micropropagação de *Cymbidium* não influenciou no número de protocormios formados por explante e ainda reduziu o peso dos mesmos. Nesse trabalho houve máxima formação de calos com 0,1 e 0,01 mg L⁻¹ de ANA e TDZ, respectivamente.

Este trabalho teve como objetivos verificar a eficiência do uso de seringas descartáveis utilizada como recipiente na cultura de tecidos de plantas de orquídeas, na ausência de câmara de fluxo laminar e, adicionalmente, a comparação entre meios de cultura com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

***Phalaenopsis* spp.**

Para este ensaio foram utilizadas seringas descartáveis de 20 mL contendo 5 mL de meio sólido com segmentos nodais de hastes florais de plantas do gênero *Phalaenopsis*. Para introdução do meio de cultivo no interior das seringas foram utilizados frascos com tampa metálica perfurada no centro com vedação de borracha, após autoclavagem do meio de cultura nestes frascos, o mesmo foi succionado através de uma agulha, solidificando-se no interior da seringa. Os tratamentos foram delineados em um fatorial (3 x 3 x 2)+1 com três meios [MS ½ (Murashige & Skoog, 1962), GB₅ (Gamborg et al., 1968) e VW (Vacin & Went, 1949)], três

reguladores de crescimento (TDZ , ANA e BAP) com duas concentrações cada (1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e um tratamento controle (MS ½ contendo 1,0 mg L⁻¹ de TDZ em tubos de ensaio onde os explantes foram manipulados em câmara de fluxo laminar). Este ensaio foi conduzido em blocos ao acaso com cinco repetições.

Os explantes coletados foram constituídos dos três segmentos nodais da haste floral logo abaixo do último botão ou flor. Os mesmos foram lavados em água corrente, posteriormente imersos em álcool etílico 70 % por 30 s, seguido pela desinfestação em NaClO 24 mg L⁻¹ (1 mL L⁻¹ de ASC) por 15 min. Após essa desinfestação, os segmentos nodais (2 cm) foram inoculados nas seringas e, após a inoculação, o conjunto foi novamente desinfestado com uma solução de NaClO a 24 mg L⁻¹ por 5 min. (Figura 1). Passado esse período de tempo, essa solução foi descartada e a seringa mantida em câmara de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, com 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 µmol m⁻² s⁻¹.

Os explantes foram mantidos no interior da seringa até a brotação das gemas e emissão de folhas.

O ensaio foi avaliado após quatro meses de cultivo considerando a resposta dos segmentos nodais aos tratamentos aplicados sendo avaliados a emissão e crescimento de brotos vegetativos e raízes no interior da seringa.

Dendrobium nobile

Para este ensaio foram utilizados os mesmos tratamentos anteriormente citados para *Phalaenopsis*. Porém, os explantes coletados constituíram-se de discos delgados obtidos de segmentos nodais do último caule (o mais jovem) emitido pela planta (Figura 2).

A desinfestação dos explantes e inoculação nas seringas foram idênticas às realizadas para o ensaio anterior.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa SAEG 9.0.

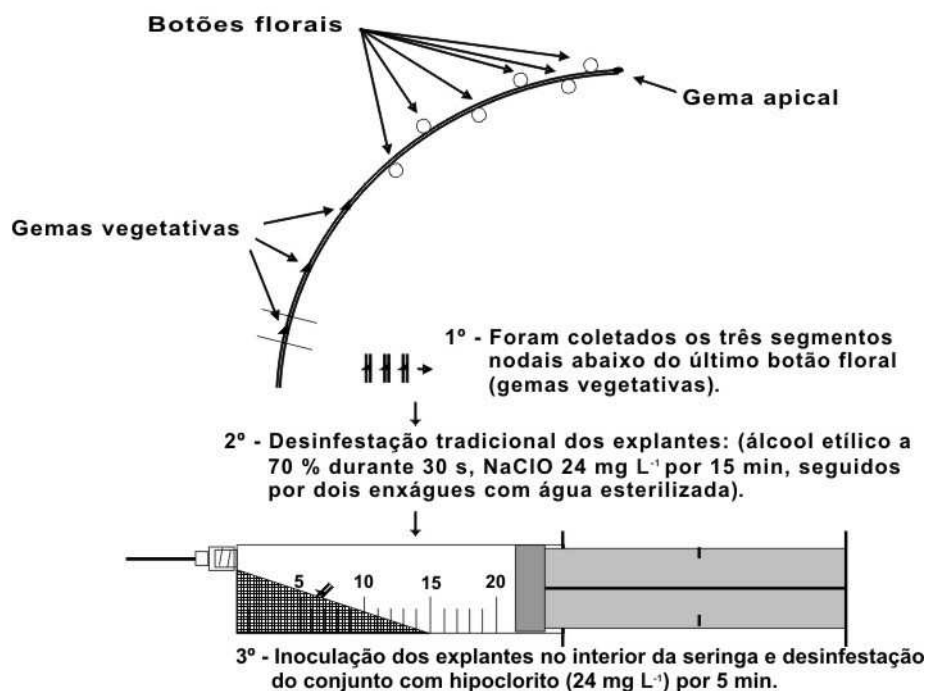


Figura 1. Segmentos nodais de hastes de *Phalaenopsis* utilizados e processo de inoculação dos mesmos em seringas descartáveis.

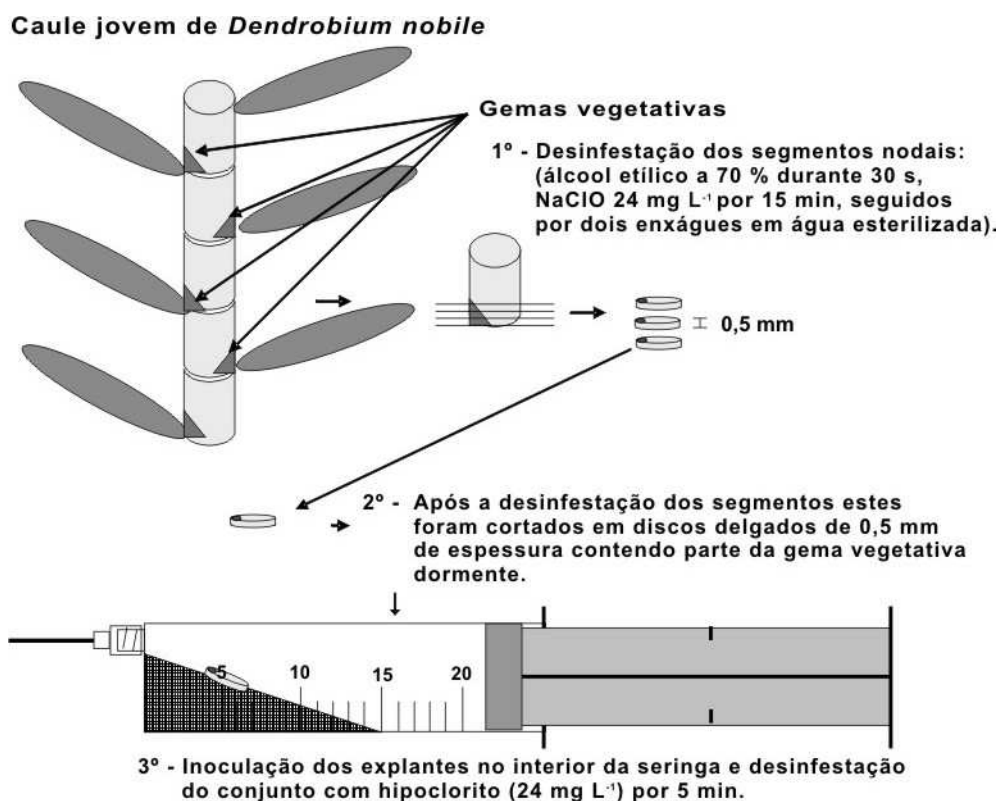


Figura 2. Discos delgados de segmentos nodais de caules jovens de *Dendrobium nobile* utilizados e processo de inoculação dos mesmos em seringas descartáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento controle apresentou contaminação e, ou, oxidação para ambas as espécies, impossibilitando a propagação *in vitro*. O efeito residual do NaClO no interior da seringa promoveu melhor desinfestação dos explantes, permitindo o crescimento e desenvolvimento dos mesmos. A produção de matéria fresca em plantas de *Phalaenopsis* spp. foi maior para os meios GB5 e VW, em comparação ao MS ½, não havendo diferença significativa entre os dois primeiros. Por outro lado, a produção de matéria fresca e número de plantas não apresentaram diferenças significativas entre meios de cultura para *Dendrobium nobile*. Por outro lado, para comprimento de folhas, o meio VW foi menor que os outros e para número de raízes o GB5 apresentou maior número, VW intermediário e o MS ½ o menor (Quadros 1, 2, 3 e 4 e Figuras 3 e 4).

Para o comprimento de folhas de *Phalaenopsis*, os melhores resultados foram obtidos com GB5 ou VW. O maior número de plantas foi obtido com o meio VW. Já o crescimento de raízes foi maior com o meio GB5 (Quadros 1 e 3). Os maiores valores para comprimento de folhas, número e comprimento de raízes foram obtidos com o meio GB5 para *Dendrobium* (Quadros 2 e 4).

Para *Phalaenopsis*, o uso de TDZ apresentou resultados superiores em relação a BAP e ANA para comprimento de folhas, número de plantas, número e comprimento de raízes para, ambas as espécies. Não houve diferenças significativas entre BAP e ANA para todas as variáveis medidas, quando se utilizou o meio MS ½. Quando se utilizou o meio GB5, o efeito de TDZ foi maior que o de BAP, este maior que ANA para massa de matéria fresca e comprimento de folhas. Para número de plantas TDZ foi maior que os outros reguladores de crescimento e, para comprimento de raízes, ANA foi menor que TDZ e que BAP. Quando se utilizou o meio VW, o efeito de TDZ foi maior que ANA e este maior que BAP, para produção de matéria fresca das plantas. Para número de

plantas, comprimento de folhas e de raízes, o efeito de TDZ foi maior que os outros reguladores de crescimento que apresentaram efeitos semelhantes. Já a produção de matéria fresca no meio MS ½, contendo TDZ, foi maior para *Phalaenopsis* spp. e menor para *Dendrobium nobile*. Para *Dendrobium nobile*, quando se utilizou o meio MS ½, os reguladores de crescimento tiveram efeito semelhante no número de plantas por seringa e comprimento de raízes. Para comprimento de folhas e número de raízes, TDZ apresentou maior efeito que ANA e BAP que foram semelhantes. Quando se utilizou o meio GB5, os reguladores de crescimento apresentaram efeitos semelhantes para as características avaliadas. Já no meio VW, para produção de matéria fresca das plantas e comprimento de folhas e de raízes de *Dendrobium*, os reguladores de crescimento apresentaram efeitos semelhantes. Mas, para número de plantas e número de raízes, o efeito de TDZ foi maior que o de ANA e BAP.

Tanto para *Phalaenopsis* como para *Dendrobium*, não se observou efeito significativo de doses (1,0 ou 2,0 mg mL⁻¹) dos reguladores de crescimento em nenhum dos meios de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Ernst (1994). Esse autor demonstrou que a adição de 0,25 ou 2,5 mg L⁻¹ de TDZ ao meio de cultura promoveu maior brotação em segmentos nodais retirados de hastes florais de *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis*, respectivamente.

A capacidade de formação de brotações múltiplas em explantes de *Phalaenopsis* é variável entre genótipos. Para dois híbridos de *Phalaenopsis*, as melhores respostas em termos de produção de brotações em pequenos segmentos da haste floral ocorreram em meio MS ½, sendo que para o híbrido *Phalaenopsis* cv. Quenn Emma os melhores resultados ocorreram na presença de 1 mg L⁻¹ de TDZ e para *Phalaenopsis* cv. WR com 2 mg L⁻¹ de TDZ (Myint et al., 2009).

Quadro 1. Produção de matéria fresca (MF), número de plantas (NP), comprimento de folhas (CF) e comprimento de raízes (CR), em resposta a meio de cultura e a reguladores de crescimento (RC) e doses (DRC) para *Phalaenopsis* spp., com a inoculação dos tecidos em seringas descartáveis

Meio	RC	DRC	MF	NP	CF	CR
		mg L ⁻¹	g/seringa	nº/seringa	mm	mm
Controle ⁽¹⁾	TDZ	1,0	0,000	0,0	0,0	0,0
	TDZ	1,0	0,411	1,4	33,4	35,0
		2,0	0,400	1,2	31,0	37,8
MS ½	ANA	1,0	0,287	1,0	27,6	26,2
		2,0	0,308	1,0	29,4	31,2
	BAP	1,0	0,264	1,0	27,6	24,4
2,0		0,313	1,0	31,4	31,4	
Média			0,331	1,1	30,1	31,0
	TDZ	1,0	0,426	1,4	40,0	46
		2,0	0,412	1,8	41,8	37,2
	ANA	1,0	0,308	1,0	31,2	32,8
		2,0	0,326	1,0	32,4	35,4
		BAP	1,0	0,341	1,0	34,8
2,0	0,380		1,0	38,2	48,4	
Média			0,365	1,2	36,4	39,9
	TDZ	1,0	0,475	2,0	44,6	35,6
		2,0	0,487	2,0	47,0	40,2
	ANA	1,0	0,345	1,2	34,0	34,6
		2,0	0,287	1,2	28,6	24,2
		BAP	1,0	0,251	1,0	26,2
2,0	0,288		1,0	29,2	28,6	
Média			0,355	1,4	34,9	30,9
	TDZ	-	0,435	1,6	39,6	38,6
	ANA	-	0,310	1,1	30,7	30,7
	BAP	-	0,306	1,0	31,1	32,4

⁽¹⁾ MS ½ contendo 1,0 mg L⁻¹ de TD em tubos de ensaio e manipulados em capela de fluxo laminar.

A formação de calos durante a propagação *in vitro* de *Phalaenopsis* pode, também, levar à formação de variantes somaclonais indesejáveis. Nesse sentido diferentes combinações de reguladores de crescimento foram utilizadas a fim de se obter embriões somáticos diretamente sobre os explantes. As concentrações de 0,1 mg L⁻¹ ou 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ BAP foram os mais eficientes para a formação de embriões somáticos em explantes de híbridos de *Phalaenopsis* (Minamiguchi & Machado Neto, 2007).

Quadro 2. Produção de matéria fresca (MF), número de plântulas (NP), comprimento de folhas (CF) e comprimento e número de raízes (CR e NR), em resposta a meio de cultura e reguladores de crescimento (RC) e doses (DRC) para *Dendrobium nobile* com inoculação dos tecidos em seringas descartáveis

Meio	RC	DRC	MF	NP	CF	CR	NR
		mg L ⁻¹	g/seringa	n/seringa	mm	mm	n/seringa
Controle ⁽¹⁾	TDZ	1,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0
	TDZ	1,0	1,082	1,0	37,2	18,4	6,8
MS ½	TDZ	2,0	1,231	1,0	40,4	16,0	7,4
		1,0	1,467	1,0	25,4	13,8	5,2
	ANA	2,0	1,175	1,0	36,2	17,4	6,0
		1,0	1,547	1,0	25,4	13,0	5,0
	BAP	2,0	1,389	1,0	27,2	14,4	6,2
		1,0	1,315	1,0	32,0	15,5	6,1
GB5	TDZ	1,0	1,232	1,2	35,2	16,0	9,2
		2,0	1,313	1,0	33,0	15,2	7,2
	ANA	1,0	1,563	1,0	28,4	12,8	6,4
		2,0	1,303	1,0	29,6	15,4	7,2
	BAP	1,0	1,399	1,0	34,2	13,6	7,8
		2,0	1,289	1,0	41,8	15,4	8,8
VW	TDZ	1,0	1,363	1,2	29,8	14,4	7,2
		2,0	1,466	1,0	34,6	14,2	8,0
	ANA	1,0	1,200	1,0	31,6	16,6	7,0
		2,0	1,410	1,0	26,0	14,2	5,6
	BAP	1,0	1,377	1,0	25,6	14,6	5,4
		2,0	1,401	1,0	29,6	14,6	5,8
Média	TDZ	-	1,281	1,1	35,0	15,7	7,6
	ANA	-	1,353	1,0	29,5	15,0	6,2
	BAP	-	1,400	1,0	30,6	14,3	6,5

⁽¹⁾ MS ½ contendo 1,0 mg L⁻¹ de TD em tubos de ensaio e manipulados em capela de fluxo laminar.

Para as duas doses de reguladores utilizadas, houve diferença significativa apenas para ANA dentro de MS ½, ocorrendo maior crescimento de folhas de *Dendrobium nobile* e maior produção de matéria fresca e comprimento de folhas para *Phalaenopsis* spp., cultivado sob 2 mg L⁻¹ de ANA dentro de VW (Quadros 1, 2, 3 e 4).

Para espécies de *Dendrobium*, as respostas a reguladores de crescimento tem sido frequentes. Assim, a propagação *in vitro* de plantas

utilizando-se finas camadas de células tem demonstrado ótimos resultados; em *Dendrobium draconis*, pequenos discos excisados ao longo do caule da planta apresentaram os melhores resultados para 2 mg L⁻¹ de BAP ou 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Nessas condições, cerca de 70 % dos explantes foram responsivos, com uma média de 11 protocormios por explante (Rangsayatorn, 2009).

Quadro 3. Análise de variância para produção de matéria fresca (MF em g/seringa), número de plantas (NP em nº/seringa), comprimento de folhas (CF em cm) e comprimento de raízes (CR em cm) de *Phalaenopsis* spp., em resposta a meios e reguladores de crescimento⁽¹⁾

FV	GL	QM			
		MF	NP	CF	CR
Repetição	4	0,0006	0,29	18,38	78,27
MS 1/2 vs GB5 + VW	1	0,0179*	0,80*	627,20***	384,27°
GB5 vs VW	1	0,0015	0,60°	32,27	1224,02**
TDZ vs ANA + BAP d/ MS ½	1	0,0844***	0,60°	68,27°	437,40*
ANA vs BAP d/ MS ½	1	0,0004	0,00	0,00	3,20
D TDZ d/ MS ½	1	0,0003	0,10	14,40	19,60
D ANA d/ MS ½	1	0,0011	0,00	19,60	62,50
D BAP d/ MS ½	1	0,0060	0,00	19,60	122,50
TDZ vs ANA + BAP d/ GB5	1	0,0429***	2,40***	303,75***	43,35
ANA vs BAP d/ GB5	1	0,0095°	0,00	110,45*	490,05*
D TDZ d/ GB5	1	0,0005	0,40	8,10	193,60
D ANA d/ GB5	1	0,0008	0,00	3,60	16,90
D BAP d/ GB5	1	0,0038	0,00	28,90	193,60
TDZ vs ANA + BAP d/ VW	1	0,2363***	5,40***	771,27***	742,02***
ANA vs BAP d/ VW	1	0,0108°	0,20	64,80	84,05
D TDZ d/ VW	1	0,0004	0,00	14,40	52,90
D ANA d/ VW	1	0,0084°	0,00	72,90°	270,40
D BAP d/ VW	1	0,0034	0,00	22,50	108,90
Resíduo	68	0,0030	0,15	23,57	109,09
CV (%)		15,61	31,78	14,36	30,79

⁽¹⁾ Como não houve propagação no tratamento controle, na análise de variância foi considerado o fatorial 3 x 3 x 2. °; *, ** e ***, respectivamente: significativo a 10, 5, 1 e a 0,1 %.

Quadro 4. Análise de variância para produção de matéria fresca (MF em g/seringa), número de plantas (NP em nº/seringa) comprimento de folhas (CF em cm) e comprimento (CR em cm) e número de raízes (NR) de *Dendrobium nobile*, em resposta a meios e reguladores de crescimento

FV	GL	QM				
		MF	NP	CF	CR	NR
Repetição	4	0,044	0,017	27	4,8	2,76
MS 1/2 vs GB5 + VW	1	0,039	0,022	2	11,2	21,36*
GB5 vs VW	1	0,006	0,000	260*	0,0	24,07*
TDZ vs ANA + BAP d/ MS ½	1	0,376*	0,000	700***	43,3	15,00
ANA vs BAP d/ MS ½	1	0,108	0,000	101	18,0	0,00
D TDZ d/ MS ½	1	0,055	0,000	25	14,4	0,90
D ANA d/ MS ½	1	0,213°	0,000	291*	32,4*	1,60
D BAP d/ MS ½	1	0,063	0,000	8	4,9	3,60
TDZ vs ANA + BAP d/ GB5	1	0,090	0,067	2	11,3	2,82
ANA vs BAP d/ GB5	1	0,040	0,000	405	0,8	11,25
D TDZ d/ GB5	1	0,016	0,100	12	1,6	10,00
D ANA d/ GB5	1	0,169	0,000	4	16,9	1,60
D BAP d/ GB5	1	0,030	0,000	144	8,1	2,50
TDZ vs ANA + BAP d/ VW	1	0,030	0,067°	107	3,3	18,15°
ANA vs BAP d/ VW	1	0,036	0,000	7	3,2	2,45
D TDZ d/ VW	1	0,027	0,100	58	0,1	1,60
D ANA d/ VW	1	0,111	0,000	78	14,4	4,90
D BAP d/ VW	1	0,001	0,000	40	0,0	0,40
Resíduo	68	0,067	0,023	54	7,1	4,73
CV (%)		19,25	14,69	23,17	17,70	32,04

°; *, ** e ***, respectivamente: significativo a 10, 5, 1 e a 0,1 %.

Em explantes foliares de dois híbridos de *Dendrobium* houve maior indução e multiplicação de brotos nas plantas submetidas a meios de cultura contendo 1 mg L⁻¹ de BAP. O melhor enraizamento foi obtido com meio contendo carvão ativado (2 g L⁻¹) (Martin & Madassery, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Sharma et al. (2007), que observaram em explantes de *Dendrobium microbulbon* a formação de 39 brotos/explantes quando os mesmos foram inoculados em meio de cultura MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de BAP. A maior regeneração de brotos em discos caulinares de um híbrido de *Dendrobium* foram obtidos em secções de 5 mm de espessura, cultivados em meio de cultura suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP ou ANA (Nhat & Dung, 2006).



Figura 3. Seguimento nodal (a) e desenvolvimento dos explantes no interior da seringa (b, c e d) de plantas de *Phalaenopsis* spp., aos 120 dias.

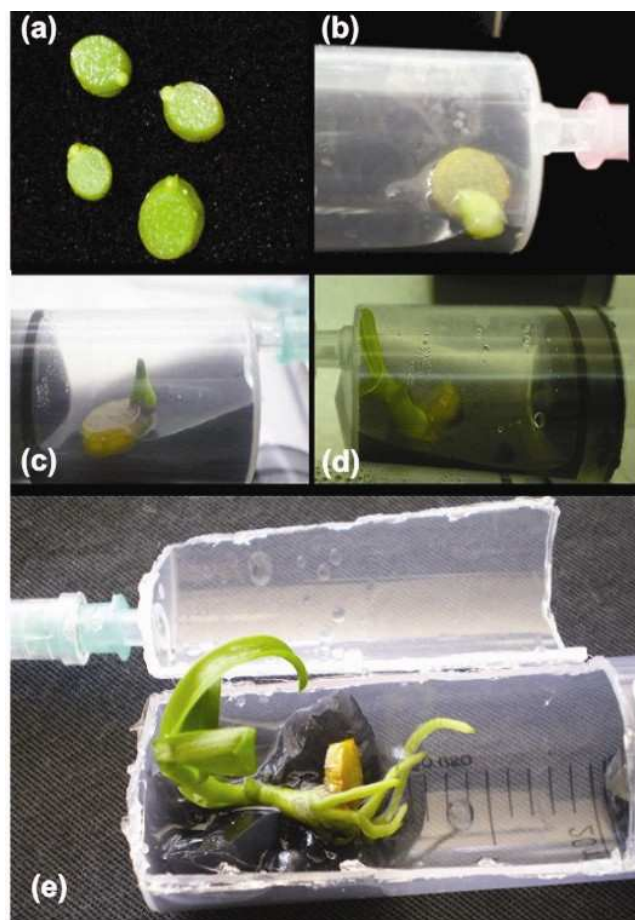


Figura 4. Discos caulinares (a) e desenvolvimento dos explantes no interior da seringa (b, c, d e e) de plantas de *Dendrobium* spp., aos 15 (b), 30 (c), 60 (d) e aos 120 dias (e).

Por outro lado, há trabalhos que mostram resultados semelhantes na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura àqueles em que os utilizam. Assim segmentos nodais de *Dendrobium candidum* cultivados em meio MS ½ enriquecido com 1 mL L⁻¹ de Hyponex® (N – 6,0; P – 3,0 e K – 3,0 dag kg⁻¹) e 90 g L⁻¹ de extrato de batata suplementado com BA (2 mg L⁻¹) e ANA (0,1 mg L⁻¹) apresentaram cerca de 70 % dos explantes com brotações laterais. Mesmo no meio onde não havia nenhum regulador de crescimento houve intensa brotação lateral em cerca de 45 % dos explantes (Shiau et al., 2005).

Resultados semelhantes foram obtidos por Ishii et al. (1998), para *Phalaenopsis*. Esses autores observaram que a indução de calos e a regeneração de plantas do *Phalaenopsis* Ricard Shaffer ‘Santa Cruz’ ocorreu espontaneamente em protocórmios subcultivados *in vitro* na presença de água de coco ou 2,4-D e BA. A presença de água de coco no meio de cultura foi suficiente para indução de calos e formação de novos protocórmios nos explantes utilizados, não sendo necessária a adição de qualquer regulador de crescimento; entretanto, esses resultados foram obtidos com protocórmios já estabelecidos *in vitro*.

CONCLUSÕES

1. O uso de seringas descartáveis é viável para a propagação vegetativa dos gêneros *Phalaenopsis* e *Dendrobium* em substituição à câmara de fluxo laminar.

2. A completa contaminação do meio no tratamento-controle impossibilitou o desenvolvimento dos tecidos *in vitro*.

3. A diferença entre os meios e doses, reguladores de crescimento e suas concentrações apresentaram efeitos de menor expressão (pouco significativos) para a maioria das variáveis de crescimento avaliadas, particularmente para o gênero *Dendrobium*.

LITERATURA CITADA

- ANJUM, S.; ZIA, M. & CHAUDHARY, M.F. Investigations of different strategies for high frequency regeneration of *Dendrobium malones* 'Victory' Afr. J. Biotechnol., 5:1738-1743, 2006.
- CHEN, J.T. & CHANG, W.C. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa shimadzu. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40:290-293, 2004.
- CHUNG, H.H CHEN, J.T. & CHANG, W.C. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41:765-769, 2005.
- ERNST, R. Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* e *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss. Org. Cul.*, 39:273-275, 1994.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158, 1968.
- HUAN, L.V.T.; TAKAMURA. T. & TANAKA, M. *Callus* formation and plant regeneration from *callus* through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci.*, 166:1443-1449; 2004.
- ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M. & TANAKA, M. *Callus* induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.*, 17:446-450, 1998.
- KUO, H.L.; CHEN, J.T. & CHANG, W.C. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve' *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41:453-456, 2005.
- MARTIN, K.P. & MADASSERY, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Sci. Hortic.*, 108:95-99, 2006.
- MINAMIGUCHI, J. & MACHADO NETO, N.B. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*:Orchidaceae. *Colloquium Agrariae*, 3:7-13, 2007.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497, 1962.

- MURTHY, H. & PYATI, A. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, 37:223-226, 2001.
- MYINT, K.T.; KIM, C.K.; CHUNG, M.Y.; PARK, J.S.; LIM, KB. & CHUNG, J.D. Cyclic Micropropagation of *Phalaenopsis* using thin cross section of floral stalk-derived leaf. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, 27:150-155, 2009.
- NASIRUDDIN, K.M.; BEGUM, R. & YASMIN, S. Protocorm like nodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. *Asian J. Plant Sci.*, 2:955-957, 2003.
- NHAT, N.T. & DUNG, T.T. In vitro propagation of *Dendrobium* orchid through thin stem section culture. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture Nong Lam University, Ho Chi Minh City*, p.20-21, 2006.
- PARK, S.Y.; MURTHY, H.N. & PAEK, K.Y. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38:168-172, 2002a.
- PARK, S.Y.; YEUNG, E.C.; CHAKRABARTY, D. & PAEK, K.Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Rep.*, 21:46-51, 2002b.
- PUCHOOA, D. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae) *Int. J. Agri. Biol.*, 6:884-888, 2004.
- ROY, J. & BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *Oculatum* Hk. *F. Sci. Hortic.*, 97:333-340, 2003.
- SHARMA, U.; RAO, R.V.; MOHAN, V.V.V. & REDDY, A.S. *In vitro* propagation of *Dendrobium microbulbon* A. Rich - A rare ethnomedicinal herb. *Indian J. Biotechnol.*, 6:381-384, 2007.
- SHIAU, Y.J.; NALAWADE, S.M.; HSIA, C.N.; MULABAGAL, V. & TSAY, H.S. *In vitro* propagation of the chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* wall. Ex lindl., from axenic nodal segments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41:666-670, 2005.
- VACIN, E. & WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, 110:605-613, 1949.
- RANGSAYATORN, N. Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb. f. from thin cross-section culture. *Sci. Hortic.* 122:662-665, 2009.

CONCLUSÕES (GERAIS)

1. Não houve contaminação dos meios de cultivo inoculados com sementes, quando a desinfestação do meio e sementes foi feita com uma única aplicação de hipoclorito de sódio (NaClO), na forma de água sanitária comercial.

2. O NaClO causou maior percentual de germinação e crescimento das plantas em relação à sua não utilização no tratamento-controle, com a utilização de câmara de fluxo laminar.

3. A câmara de fluxo laminar mostrou-se desnecessária em relação à desinfestação de semente e meio de cultura feito com a aplicação de NaClO.

4. A aplicação de NaClO sobre o meio de cultura inoculado com tecido de plantas de orquídeas promoveu eficiente controle da contaminação (inicial e tardia).

5. Concentrações crescentes de NaClO utilizados na desinfestação no cultivo de tecidos causaram redução no crescimento das plantas.

6. O uso de carvão ativado no meio promoveram os melhores resultados, quanto à produção de plantas mas, por outro lado, a contaminação foi maior na sua presença.

7. A utilização de seringas descartáveis, sem o uso de câmara de fluxo laminar, mostrou-se viável para a propagação vegetativa das plantas. No caso do tratamento-controle, com a utilização da câmara de fluxo laminar, a contaminação ocorreu em todos os frascos.

Embora com alguns efeitos significativos para meios de cultivo, reguladores de crescimento e suas concentrações, houve tendência para a similaridade das plantas obtidas, considerando-se a idéia central deste trabalho de simplificar os procedimentos de propagação de plantas de orquídeas.