



CHARLES MILLER ANASTÁCIO RIBEIRO

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES NO DESENVOLVIMENTO
IN VITRO DE *Cattleya loddigesii* Lindley (ORCHIDACEAE)**

INCONFIDENTES/MG

2016

CHARLES MILLER ANASTÁCIO RIBEIRO

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES NO DESENVOLVIMENTO
IN VITRO DE *Cattleya loddigesii* Lindley (ORCHIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito de conclusão do curso de Tecnologia em Gestão Ambiental no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes, para obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental.

Orientadora: Prof^ª DSc. Lucia Ferreira

INCONFIDENTES - MG

2016

CHARLES MILLER ANASTÁCIO RIBEIRO

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES NO DESENVOLVIMENTO
IN VITRO DE *Cattleya loddigesii* Lindley (ORCHIDACEAE)**

Data da aprovação: ___ de _____ de 2016

**Orientadora: Prof^a. DSc. Lucia Ferreira
IFSULDEMINAS- Campus Inconfidentes**

**Co-orientadora: Prof^a. DSc. Melina Espanhol Soares
Universidade Federal de Itajubá- UNIFEI**

**Msc. Eric Aruda Williams
Escola Nacional de Botânica Tropical**

**Prof^o. DSc. Jamil de Moraes Pereira
IFSULDEMINAS- Campus Inconfidentes**

A minha família, em especial ao meu avô Vicente Ribeiro Rosa (in memoriam)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pela minha vida, pela oportunidade de viver a cada dia que se passa, por todas as bênçãos concedidas, e por não me abandonar nos momentos de tribulações.

Ao meu pai Wilson Ribeiro Rosa pelo amor e por todas as lutas que passou por mim, e que muitas vezes desistiu dos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, a minha mãe Adriane Anastácio Ribeiro pelo amor e carinho incondicional que tem comigo, minhas irmãs Grazielle Aparecida Anastácio Ribeiro e Ana Clara Anastácio Ribeiro pelo amor e companheirismo.

Aos meus avós, Castorina de Bastos Alvarenga, Maria Lúcia Custódio, João Anastácio Barbosa e Vicente Ribeiro Rosa pelo amor e cuidado que sempre tiveram comigo e pelo enorme apoio, em especial minha avó Castorina, que para mim, é minha segunda mãe e um exemplo de mulher.

Aos meus bisavós José Anastácio Alvarenga e Berenice de Bastos Alvarenga, que já estão na glória com Deus, mas sempre os levarei dentro do meu coração, e jamais esquecerei do quão sábios foram aqui na terra.

A todos os meus familiares: tia Carolina, tia Berenice, Angela, Marinês e Thiago.

Aos meus primos: Cleusa, Neto, Ana Clara e Maria Julia por terem me ajudado todo esse tempo na faculdade, pelas caronas, pelas conversas e pelo cafezinho na volta.

A minha madrinha Maria Aparecida e seu esposo José Maria pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos: Carol, Rosiane, Nayara, Jaine, Maiana, Marcela, Ana Paula, Karina e Pamela por toda a força e companheirismo.

Ao meu amigo Enderson (Dandão) pelas caronas que sempre me dava, pelas boas conversas.

Às minhas orientadoras Melina e Lucia, as quais não tenho palavras para descrever o quão especial se tornaram, agradeço por terem dedicado parte de seu tempo para me ajudar, auxiliar e aconselhar nas minhas tomadas de decisões.

Ao Sr. Vando, Prof. Jamil e Prof^a Hebe pelo auxílio e empréstimo de equipamentos laboratoriais para que eu pudesse realizar os meus trabalhos experimentais.

Aos colaboradores do meu projeto de pesquisa: Newton, Pâmela, Joany, Cecília, Alana e Maiana agradeço pelo apoio durante a realização de todos os experimentos.

A Fundação Jardim Botânico de Poços de Caldas pelo estágio oferecido, confiança e respeito para com o meu trabalho. Em especial o biólogo Éric Williams.

Aos meus amigos do Edifício Vô Chiquito: Will, Gabriel, Amane e Wesley.

RESUMO

A propagação de orquídeas in vitro têm sido uma alternativa na obtenção de um alto número de plantas e em decorrência disto proporcionar boas condições de cultivo em seu desenvolvimento, resultando plantas de qualidade. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento da *Cattleya loddigesii* Lindley, em cultivo in vitro sob três métodos de desinfecção de sementes; água destilada, seringa e cápsula verde, determinando os parâmetros de germinação, comprimento de raiz, números de raízes e folhas, altura e massa seca das plântulas. Os métodos água destilada e seringa obtiveram os melhores resultados no desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: Orquídeas. Propagação de espécies. Cultivo in vitro. Desinfecção de sementes.

ABSTRACT

The propagation of orchids in vitro have been an alternative in getting a large number of plants and as a result it provide good growing conditions in its development, resulting quality plants. Thus, the objective of this study was to evaluate the development of *Cattleya Lindley loddigesii* in vitro culture from three seed disinfection methods; distilled water, syringe and green capsule, determining the parameters germination, root length, root numbers and leaves, height and dry mass of seedlings. Methods distilled water and syringe obtained the best results in the development of seedlings.

Keywords: Orchidaceae. Propagation of species. In vitro culture. Seed disinfection.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Cattleya loddigesii</i> Lindley.....	3
2.2 FLORICULTURA E PRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS	4
2.2.1 GERMINAÇÃO DAS ORQUÍDEAS EM MEIO NATURAL.....	5
2.3 PROPAGAÇÃO IN VITRO	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	8
3.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA	8
3.2 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE SEMENTES	9
3.1 AVALIAÇÃO DA PROPAGAÇÃO IN VITRO	10
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS DE SEMEADURA	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5 CONCLUSÕES	17
6 REFERÊNCIAS	18

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias das Angiospermas, e no Brasil, representado por 235 gêneros dos quais 67 são endêmicos. Além disso, são encontradas cerca de 2419 espécies, sendo 1620 endêmicas, O Brasil, Colômbia e a Venezuela são os países com maior diversidade e quantidade de espécies dessa família (BARROS, 2012).

Estão distribuídas geograficamente em todo território brasileiro, com maiores domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (BARROS, 2012), e em trabalho realizado por STEHMANN et al. (2009), ele expõe as orquídeas como a família com maior predomínio e riqueza a nível genérico e específico para a o bioma Mata Atlântica, sendo assim considerado um dos centros de diversidade da família.

As orquídeas são reconhecidas mundialmente em função do seu valor ornamental, porém e seu desaparecimento do ambiente natural é crescente e ligados aos mais diversos fatores relacionados as atividades humanas, principalmente o extrativismo predatório. Isto ocorre devido às características ornamentais, por isso são retiradas excessivamente da natureza, levando inúmeras espécies à extinção (RIBEIRO,2015), nas quais se destacam o gênero *Cattleya*.

Este gênero é considerado um dos mais importantes, com maior presença de espécies na região Sudeste do Brasil, apresentando diversidade e valor ornamental. Além disso, espécies desse gênero são muito utilizadas no desenvolvimento de híbridos interespecíficos, que se

caracterizam pelo cruzamento de plantas a partir de indivíduos de espécies diferentes e intergenéricos que são denominados através do cruzamento de espécies de dois ou mais gêneros diferentes para fins comerciais (VAN DEN BERG 2008).

Em função de seu relevante interesse econômico, as orquídeas são vistas apenas como plantas ornamentais de cunho produtivo, onde a percepção de sua função ecológica passa despercebida. Além do interesse comercial, as orquídeas são caracterizadas como indicadoras de sucessão ecológica, conforme Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 32, de 7 de dezembro de 1994. Esta resolução inclui a presença das epífitas na caracterização de vegetação primária e secundária nos estágios: inicial, médio e avançado e de regeneração natural da Mata Atlântica.

Sabendo-se da dificuldade da propagação em meio natural, a germinação de sementes de orquídeas in vitro vem sendo uma alternativa visando a obtenção de um grande número de plantas em tempo relativamente curto e com alta qualidade fitossanitária. Essa técnica auxilia na diminuição dos riscos de extinção de espécies de orquídeas e vem sendo realizada desde o início do século XIX, e segundo Suzuki e Ferreira (2007), como uma ferramenta é importante.

A espécie *Cattleya loddigesii* Lindley apresenta relevância no mercado florístico por proporcionar um bom número de flores, podendo apresentar de três a seis flores e tamanho das flores em torno de 8 a 11 cm, sendo elas de coloração atrativas e resistentes, aumentando o seu tempo de floração (CARDOSO & ISRAEL, 2005). A mesma é nativa das regiões sul e sudeste do Brasil (WATANABE & MORIMOTO, 2007).

O presente trabalho teve por objetivo testar o desenvolvimento in vitro da *Cattleya loddigesii* Lindley, por meio de três métodos de desinfecção das sementes, afim de avaliar os parâmetros do índice de germinação, comprimento de raiz, números de raízes, altura e massa seca das plântulas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cattleya loddigesii* Lindley.

O gênero *Cattleya* é considerado um dos mais importantes da família Orchidaceae, em função da sua diversidade e alto valor ornamental, além da sua importância no desenvolvimento de híbridos interespecíficos e intergenéricos para fins comerciais (van der BERG 2014).

A espécie *Cattleya loddigesii* Lindley é uma espécie brasileira nativa encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil (WATANABE & MORIMOTO, 2007) (FIGURA 1). Apresenta de três a seis flores, com 8 a 11cm de envergadura e com espata na base, geralmente plantas bifoliadas. O período de ocorrência de floração vai do outono até a primavera. São plantas epífitas, ou seja, dependem de árvores para suporte, a fim de receber luz e umidade. São mais encontradas em regiões elevadas e matas com elevado grau de umidade (MILLER & WARREN, 1996; ARAUJO, 2004). São adaptadas a ambientes com alta luminosidade, não sendo favorável o seu cultivo em umidades elevadas e ambientes muito sombreados (MENDES, 1996).



Figura 1. *Cattleya loddigesii* Lindley. Fonte: plantas-ornamentais.com

2.2 FLORICULTURA E PRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS

O comércio de flores vem sendo considerado uma atividade econômica de alta importância para o agronegócio em nível nacional e internacional, em especial por oferecer empregos de forma direta ou indireta, como pelo valor de produção e comercialização (CANÇADO JUNIOR et al.;2005). O comércio florístico vem girando em torno de 100 bilhões de dólares anualmente considerando toda a cadeia produtiva (CASTRO,1998; BRASIL,2005), já o Brasil movimenta mais de 1 bilhão de dólares anualmente, de acordo com informações do Instituto Agrícola de São Paulo (CASTRO,1998).

A família Orchidaceae Juss compreende à ordem Asparagales Link (APGIII 2009), atualmente sendo composta por cerca de 24.000 espécies (DRESSLER 2005) e 736 gêneros (CHASE et al. 2015).

Além do aspecto ornamental, de gêneros são extraídos produtos alimentícios largamente utilizados, como a baunilha (espécies do gênero *Vanilla*), medicinais e outros utilizados na indústria cosmética (HOEHNE, 1941; ZHANG et al., 2007).

STANCATO, (2001), relata que no mercado florístico, as orquídeas são comercializadas tanto como plantas ornamentais, como para flores de corte, sendo muito apreciadas pela sua beleza e durabilidade.

De acordo com (VENTURA, 2002), no caso de produção de orquídeas no Brasil, não há dados oficiais que relatam sobre a produção e exportação dessas plantas, e segundo (FARIA,2000), o mercado de orquídeas apesar de ser lucrativo e promissor, é pouco explorado, uma vez que o mercado comprador se torna rigoroso quanto a qualidade e novidade de plantas para aquisição. Nesse sentido, mundialmente o comércio de orquídeas gera mais de 20 milhões de dólares por ano (MOREIRA ,2007).

No início do século XX houve uma maior impulsão no que se trata de produção de orquídeas a nível de comércio, dando-se em função do aperfeiçoamento de técnicas de multiplicação de plantas, já que nessa época pouco se sabia sobre a reprodução dessas plantas (ARDITTI & ERNEST, 1992).

2.3 GERMINAÇÃO DAS ORQUÍDEAS EM MEIO NATURAL

As orquídeas apresentam uma característica única entre as angiospermas, que é a presença de uma estrutura parenquimatosa, o protocórmio, com a finalidade de definir o estágio de semente e plântula utilizada na digestão enzimática de fungos simbiotes como meio alternativo para a obtenção de energia, fenômeno denominado micotrofismo (CLEMENTS 1988; PETERSON *et al.* 1998).

Geralmente, nas orquídeas encontram-se associados às raízes os fungos micorrizos. Embora muitas espécies possam crescer satisfatoriamente sem a associação, principalmente após terem produzido seu próprio alimento pela fotossíntese. Todas as orquídeas necessitam dessa associação para desenvolver nos primeiros estágios de seu crescimento (TOSCANO-DE-BRITO & CRIBB 2005), em razão de sua pequena reserva nutricional.

Os produtos advindos da sua digestão enzimática são utilizados para o desenvolvimento do protocórmio, a partir do embrião contido na semente madura (PETERSON *et al.* 1998). Esses mecanismos vão caracterizar o micoheterotrofismo, onde o protocórmio será totalmente dependente de um fungo simbiote para o seu desenvolvimento até tornar-se plântula autotrófica.

A propagação natural por sementes é demorada, e dos aproximados 2,5 milhões de sementes produzidas numa cápsula, somente 5% germinam. Portanto, o cultivo em meio nutritivo possibilita um maior aceleração nesse processo, além de aumentar a taxa de germinação, tornando o processo de multiplicação de orquídeas comercialmente viável (MORAES, 2003).

Por outro lado, as técnicas de propagação *in vitro* têm apresentado grande benefício quanto à germinação natural, incluindo vantagens quanto as espécies ameaçadas em extinção, aumentando a germinação de 98% a 100%, acelerando e facilitando o processo de desenvolvimento, conseqüentemente oferecendo plantas saudáveis e vigorosas, assim podendo manter o banco de germoplasma (MARTINI et al.; 2001).

2.4 PROPAGAÇÃO IN VITRO

As sementes de orquídeas, em razão do reduzido tamanho e ausência de endosperma, necessitam para sua germinação ser colonizadas por fungos micorrízicos e a outra alternativa é utilizar a sementeira *in vitro* em condições assépticas em um meio de cultura contendo sais minerais e uma fonte de açúcar (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010).

A micropropagação *in vitro* é reconhecida com uma técnica útil para produção em larga escala, de plantas com elevada qualidade e uniformidade. Através do desenvolvimento de protocolos específicos, torna-se possível o cultivo de espécies vulneráveis para comercialização ou para repovoamento (AMO et al. 2009). Nesse sentido, a micropropagação proporcionou resultados expressivos com outras espécies classificadas “em risco” (DUTRA et al. 2008; ÁVILA – DIAZ et al. 2009; ROY et al. 2011).

Lewis Knudson (1922), descobriu nas décadas de vinte a quarenta, a possibilidade de realizar a germinação das sementes e o recultivo de plântulas de orquídeas “*in vitro*” assimbiótico, ou seja, na ausência do fungo, na presença de sais minerais e carboidratos solúveis em meio de cultura geleificado com ágar (MILANEZE, 1997). A partir de então o comércio de plântulas de orquídeas produzidas em laboratório aumentou significativamente, contribuindo para aliviar as pressões sobre as espécies nativas.

Os meios nutritivos utilizados no cultivo “*in vitro*” possuem a capacidade de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas contendo sais inorgânicos, sacarose, aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas (BUTCHER; INGRAM, 1976; DIXON, 1985). A

propagação in vitro, mesmo sendo uma técnica onerosa em termos de mão-de-obra, de laboratório e de equipamentos, oferece o melhor custo-benefício, pois é possível produzir, em escala comercial, vegetais uniformes com características selecionadas, bem como realizar pesquisas (CID, 2010).

A cultura assimbiótica ou semeadura in vitro de orquídeas, é utilizada no Brasil há cerca de 25 anos, com o principal objetivo de aumentar a produção de mudas, o que reduz seu custo e contribui para evitar a extinção de diversas espécies de orquídeas (STANCATO, BEMELMANS, VEGRO, 2001). Este tipo de cultura resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrizos simbiotes (MARTINI et al., 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Câmpus Inconfidentes.

4.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O material vegetal estudado na pesquisa foi uma cápsula da espécie *Cattleya loddigesii* Lindley cedida por uma cultivadora da cidade de Inconfidentes, Minas Gerais.

O meio de cultura foi preparado pelo produto em pó comercial B&G® como apresentado na tabela 1, sendo seu conteúdo dissolvido em um litro de água destilada, em pH ajustado para 6,0 e acrescentado 10 g L⁻¹ de Ágar, com o intuito de dar consistência ao meio de cultura. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C sobre pressão de 1 atm por 20 minutos, posteriormente permaneceram em repouso por 24 horas, antes de serem utilizados para o semeio.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura B&G®.

Componentes	Quantidade (g)	Concentração do meio de cultura (g/L)
Sais Minerais	5	5
Açúcares	40	40
Carvão ativado	2	2

Fonte: Adaptado do rótulo do meio de cultura B&G®.

4.2 MÉTODOS DE TRATAMENTO DE SEMENTES

Os métodos de desinfecção de sementes estudadas para o cultivo in vitro da espécie estudada foram testadas a partir de cápsula verde. A cápsula contendo as sementes possuía 5 meses em grau de maturidade (Figura 2). Todo o processo de semeadura foi realizado em câmara de fluxo laminar. Foi utilizada 0,05 gramas de sementes para o estudo de desinfecção das sementes para cada tratamento.

Foram aplicados os seguintes métodos: água destilada, método da seringa e da cápsula verde.



Figura 2 – Abertura da cápsula de *Cattleya loddigesii* Lindley para semeio, Inconfidentes, 2016.

O “método da água destilada” (AD) foi realizado de acordo com ARDITTI e ERNEST (1992). Nesse método, as sementes foram colocadas em um béquer de 25 ml contendo uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e submetidas à agitação manual durante cinco minutos utilizando um bastão de vidro, num béquer contendo um volume de 25 ml. Posteriormente, as sementes foram peneiradas em uma peneira de 0,0125 mm, lavadas em álcool 70% e, por fim, foram submetidas a 4 lavagens subsequentes com água destilada. Com volume de 1 ml foi realizado o semeio, utilizando uma seringa contendo as sementes em água destilada da última lavagem.

O “método da seringa” (MS) foi realizado de acordo com o método tradicional utilizado por cultivadores de orquídeas proposto pela empresa B&G® flores. Neste método as sementes foram mergulhadas numa solução de 20 ml de hipoclorito de sódio a 5%, sendo que 1(un) ml desta solução contendo as sementes despejado sobre o meio de cultura.

No “método cápsula verde” (CV) foi utilizado um fruto da espécie, a cápsula que foi desinfestada. Para a desinfecção da cápsula, foi feita a lavagem em água corrente por cinco minutos utilizando-se uma peneira. Após este procedimento estas ficaram em imersão em solução de álcool 70% e com hipoclorito de sódio (concentração de 1%) por um minuto.

O desenvolvimento de cada método de semeadura in vitro ocorreu em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, em uma sala fechada.

4.1 AVALIAÇÃO DA PROPAGAÇÃO IN VITRO

A análise da propagação ocorreu 19 dias após o semeio. Neste período avaliou-se o início da germinação dos três métodos utilizados. A avaliação da germinação foi realizada por meio da comparação de imagens dos frascos. Para o semeio utilizou-se 0,05 gramas das sementes presentes em cada cápsula nos métodos respectivos, no qual foi impossível determinar a quantidade de sementes germinadas por frascos. Após 120 dias da semeadura no meio de cultura, realizou-se as medições dos parâmetros: altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), peso da massa fresca (MF) e matéria seca (MS), comprimento da maior raiz (CMR) e maior folha (CMF).

A medição da altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e maior folha (CMF) foi realizado com o auxílio de um paquímetro. O peso da massa fresca (MF) foi utilizado uma balança analítica onde pesou-se as 50 plântulas recém retiradas dos frascos, e por fim para medir a matéria seca (MS) das plântulas utilizou-se uma estufa de secagem, onde as plântulas permaneceram numa temperatura de 60°C por 48 horas e foram encobertas com um papel pardo impedindo que houvesse interferência, como por exemplo, o umedecimento das plântulas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS DE SEMEADURA

Para a análise estatística, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado e as análises de comparação de médias de cada parâmetro foram realizadas após 120 dias da semeadura foram realizadas por meio de Scott-Knott 5%, no programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes ocorreu num período de 19 dias após a semeadura, (Figura 3,) onde todos os frascos correspondentes a todos os métodos não apresentaram contaminação por fungos e bactérias (Figura 4).

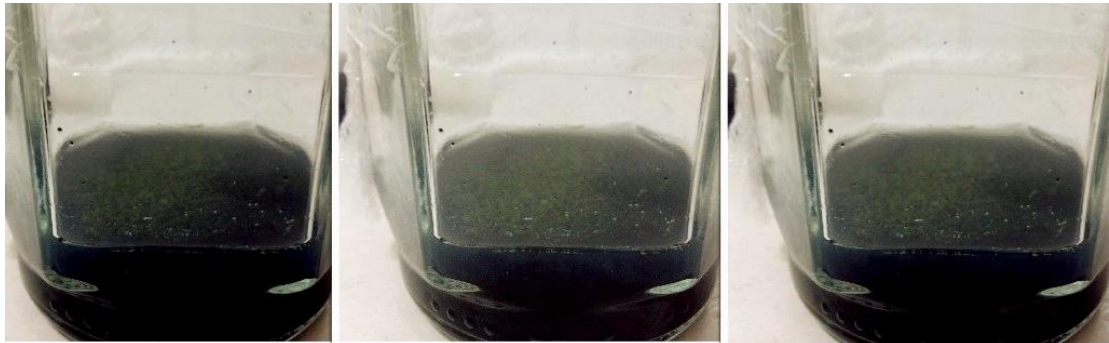


Figura 3. Germinação das sementes de *Cattleya loddigesii* Lindley, após 19 dias de semeadura, Inconfidentes, Brasil, 2016.



Figura 4. Ausência de contaminação por fungos durante a etapa de germinação das sementes de *Cattleya loddigesii* Lindley, Inconfidentes, Brasil, 2016.

A germinação foi considerada após a emissão do protocormo Arditti (1992) e KRAUS et al. (2006) em que as sementes rompem seu tegumento liberando o embrião desenvolvendo o protocormo, pequenos folículos clorofilados como apresentado na Figura 5. O método que apresentou visualmente maior germinação das sementes da *Cattleya loddigesii* Lindley foi a do método de desinfecção da cápsula verde (CV), seguido pelo método da seringa (MS), e água destilada (AD).



Figura 5. Protocormos de *Cattleya loddigesii* Lindley com 39 dias após a germinação, nas metodologias de tratamento das sementes: AD (A), MS (B) e CV (C), Inconfidentes, Brasil, 2016.

A diluição das sementes em solução de 5% de hipoclorito de sódio para o método da seringa (MS) e água destilada (AD) possibilitou uma separação, distribuição e melhor espalhamento das sementes. Entretanto, no método da cápsula verde, as sementes foram

inseridas no meio de cultura diretamente, o qual impossibilitou uma maior homogeneidade do cultivo das sementes.

O método da seringa (MS) apresentou desenvolvimento significativo das plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley, em função dos parâmetros avaliados, tendo maiores valores de comprimento de raízes, número de raízes, altura e massa seca das plântulas em relação ao método da cápsula verde (CV) apresentado na (Figura 6). Para a altura das plântulas, o método da seringa (MS) foi mais significativo. Pode ser justificado pela melhor homogeneidade que a solução de 1ml lançada nos frascos nos métodos (AD) e (MS) inserida no meio de cultura proporcionou na fase de germinação, tendo uma germinação regular, fazendo com que tivesse maior espaço e oferta de nutrientes para um melhor desenvolvimento das plântulas. Já o hipoclorito de sódio auxiliou na prevenção de contaminação para os três métodos, valendo também para o método da cápsula verde (CV). Diversos trabalhos vêm sendo realizados utilizando o hipoclorito de sódio com o objetivo de diminuir as perdas de vegetais cultivados in vitro em decorrência de contaminação fúngicas e bactericidas. Em experimento, COUTO et al. (2004) testando a desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla*, verificaram que 89 % da contaminação era proveniente da não realização de desinfecção das sementes não sendo submetidas a hipoclorito de sódio. E como relação à germinação das sementes houve em torno de 85 % da germinação em concentração a 5% de hipoclorito de sódio. Portanto faz-se necessário a utilização da desinfecção de sementes de orquídeas na propagação in vitro, mesmo se a cápsula estiver estéril (fechada), pois após a abertura, a mesma estará exposta a condições externas e em possíveis risco de contaminação.

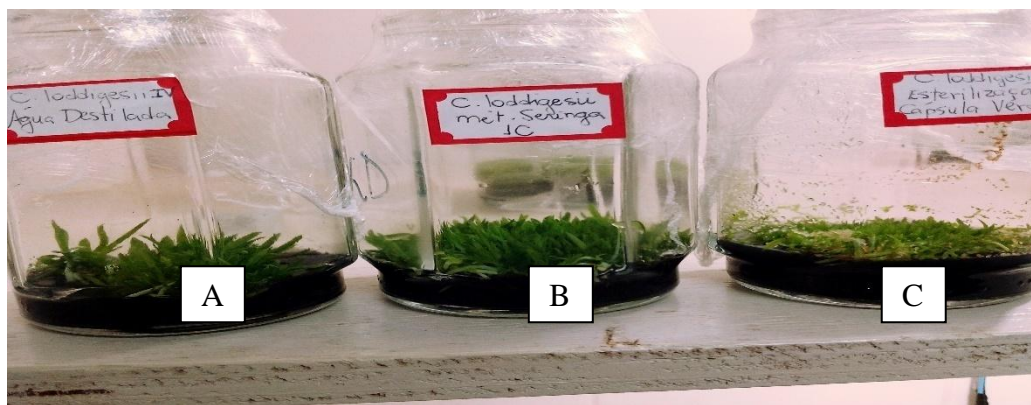


Figura 6. Plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley após 120 dias de germinação após os métodos de sementeira AD (A), MS (B) e CV (C).

Comparando-se o efeito dos diferentes métodos: água destilada (AD), método da seringa (MS) e cápsula verde (CV) no desenvolvimento das plântulas (Tabela 2), verificou-se que nos métodos água destilada e seringa não houve diferença significativa, exceto na altura das plântulas, onde o (MS) apresentou maiores valores (Tabela 2). No método cápsula verde (CV), nota-se que houve um desenvolvimento irregular, podendo observar que há uma falta de espaço para o desenvolvimento das plântulas se comparado com os outros métodos. Voltado para uma produção em grande escala, este método pode influenciar no atraso do desenvolvimento das plântulas de orquídeas.

Tabela 2. Efeito dos diferentes métodos de semeadura da espécie *Cattleya loddigesii* Lindley após 120 dias da semeadura. As letras que seguem as medidas são referentes ao teste estatístico Scott-Knott 5%. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença entre os métodos de desinfecção.

Métodos	Comprimento de raízes (cm) \pm desvio padrão	Número de raízes \pm desvio padrão	Número de folhas \pm desvio padrão	Altura das plântulas (cm) \pm desvio padrão	Massa seca das plântulas (g) \pm desvio padrão
AD	1,34 \pm 0,32 A	1,47 \pm 0,43 A	1,69 \pm 0,45 A	2,27 \pm 0,67 B	0,13 \pm 0,02 A
CV	0,55 \pm 0,04 B	0,98 \pm 0,23 B	1,15 \pm 0,10 B	1,53 \pm 0,40 C	0,09 \pm 0,05 B
MS	1,45 \pm 0,43 A	1,45 \pm 0,44 A	1,70 \pm 0,63 A	2,71 \pm 0,61 A	0,16 \pm 0,04 A
Teste F	11,34	25,76	39,41	21,16	16,12

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, comparada na coluna para comprimento de raízes, número de raízes, número de folhas, altura das plântulas e massa seca, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$). AD = água destilada; CV= capsula verde; MS = método da seringa.

Nota-se que os métodos AD e MS foram os que apresentaram melhores resultados se comparado ao método da CV. Isso porque provavelmente não sofreram variações quanto ao comprimento de raízes, número de raízes, número de folhas e massa seca das plântulas, enquanto o método cápsula verde apresentou resultados inferiores em todos os parâmetros avaliados.

Pode ser pelo fato de que a agitação da água destilada e do hipoclorito de sódio na seringa possibilitou maior uniformidade da concentração de sementes na solução. Entretanto, a concentração de hipoclorito utilizado nas metodologias AD e MS foram iguais, sendo que os parâmetros avaliados não tiveram significância, exceto para a altura das plântulas, dessa forma a necessidade a desinfecção com o hipoclorito de sódio se torna necessária inclusive quanto a

prevenção de contaminação nos meios de cultura. Em cultivo in vitro de jabuticabeira *Myrciaria* spp., PICOLOTTO (2007), observou que o hipoclorito de sódio (NaOCl) em concentração a 5% agiu em boa eficiência como desinfetante na contaminação de fungos, onde proporcionou uma redução da ação de fungos em frascos cultivados.

6 CONCLUSÕES

O método da seringa (MS) e água destilada (AD) foram os que apresentaram melhores resultados para o cultivo *in vitro* para a espécie *Cattleya loddigesii* Lindley, pois foram os métodos que melhor corresponderam aos tratamentos de desinfecção, para os parâmetros avaliados de comprimento de raízes, número de raízes e folhas, altura e massa seca das plântulas.

Para a propagação de orquídeas *in vitro* recomenda-se a utilização de métodos de desinfecção incluindo o hipoclorito de sódio em concentração a 5% objetivando uma menor perda da germinação por ações de microrganismos.

7 REFERÊNCIAS

AMO, S.O.; FINNIE J.F.; VAN STANDEN, J. In vitro propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , v. 96, p. 273 – 278. 2009.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

ARAÚJO, D. de. Cultivo de Orquídeas - *Cattleyas*, as mais belas orquídeas brasileiras. **Revista Brasileira Orquídeas**, v.8, p.18-26, 2004.

ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. 1^a ed. California, A Wiley – Interscience Publication, 1992. 682 p.

ÁVILA-DÍAZ, I et al . In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n. 99, p. 335–343. 2009.

BARROS, F. et al. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.

BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. **Organs and embryos**. In Plant Tissue Culture.[s. l.]: Edwad Publishing Limited, 1976, p. 3 – 15.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de desenvolvimento de flores e plantas ornamentais – PROFLORES**. Brasília, 2003.

Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 23 maio de 2016.

CANÇADO JUNIOR, F. L.; PAIVA, B. M.; ESTANISLAU, M. L.L. Perspectivas para exportação de flores e plantas ornamentais. **Informe Agorpecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227 ,p. 96-102, 2005.

CARDOSO, J.C.: ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. *Horticultura Brasileira*, v.23, n.2, p.169-173, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n2/25046.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2016. doi: 10.1590/S0102-05362005000200001.

CASTRO, C. E. F. Os atores da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 4, n. 1/2 ,p. 1-46, 1998.

CHASE MW, CAMERON KM, FREUDENSTEIN JV, SALAZAR G, van den BERG C, SCHUITEMAN A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177:151–174.

CID, L.P.B.;Teixeira, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: *Cultivo In Vitro de Plantas*. Brasília: L. Pedro Barrueto Cid, 2010. Cap. 1, p. 15-49.

CLEMENTIS, M.A. Orchid micorrhizal associations. *Lindleyana*, n.3, p.73 -86, 19988.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 32, de 7 de dezembro de 1994. Disponível em:

<(http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_1994_032.pdf)>

Acesso em: 15 maio de 2016.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L. & FONSECA, E. P. 2004. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642.

DRESSLER RL. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155 –158.

DIXON, R.A. (Ed.). *Plant cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL, p.169-191, 1985.

DUTRA, D. et al. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, n.94, p. 11–21, 2008.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. *Cultivo de Orquídeas –Londrina, PR*, 2010.

FARIA, R. Orquídeas feitiço em flor – Paixão seletiva. *Revista Globo Rural*, São Paulo, v. 15, n.179, p.34-43, out. 2000. Disponível em: <http://globorural.glo.com/barra>. Acesso em: 02 junho 2005.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

HOEHNE FC. 1941. *O Jardim Botânico de São Paulo*. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. 656p.

KRAUS et al. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. in vitro: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea*, 2006. v.33, p.177-184.

MARTINI, P. C. et al. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura in vitro. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, 2001.

MENDES, M. A. Conversa sobre a *Cattleya walkeriana*. *Boletim CAOB*, v. 24, 1996. Disponível online em: < <http://www.acw.arvore.com.br>>. Acesso em: 02 de março 2016.

MILANEZE, M. A. Estudos em orquídeas nativas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimbiótico. Rio Claro, 234 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista. 1997.

MILLER, D.; WARREN, R. Orquídeas do Alto da Serra. *Salamandra Ltda*, v.1, p.200-228, 1996.

MORAES, L. M. Influência do Carvão Ativado na Propagação in vitro de Três Espécies de Orquídeas Brasileiras. Londrina, 2003. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina.

MOREIRA, C. N. S. S.; SANTOS, C. D.; SOUZA, J. T. Isolamento de microrganismo patogênicos a orquídeas no Recôncavo da Bahia. *XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. v. 32. 2007. p.192.

PETERSON, R. L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*, 25: 29-55, 1998.

PICOLOTTO, L. et al Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. *Scientia Agraria*, v.8, n.1, p.19-23, 2007.

RIBEIRO, Charles Miller Anastácio et al. Desenvolvimento in vitro de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) sob diferentes métodos de semeadura. In: 7ª Jornada Científica e Tecnológica 4º Simpósio da Pós-Graduação do IFSULDEMINAS. 2015.

STEHMANN JR, FORZZA RC, SALINO A, SOBRAL M, COSTA DP, KAMINO LHY. 2009. Diversidade taxonômica na Floresta Atlântica. Em: STEHMANN JR, FORZZA RC, SALINO A, SOBRAL M, COSTA DP, KAMINO LHY. Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil.

SUZUKI, R.M.; FERREIRA, W.M. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: L.M. BARBOSA; N.A. SANTOS-Jr, (orgs.). A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. 1 ed. Imprensa Oficial do Estado, São Paulo. 2007. p. 655-659.

TOSCANO-DE-BRITO, A.L.V. & CRIBB, P. 2005. Orquídeas da Chapada Diamantina. São Paulo: Nova Fronteira.

ROY, A.R.; PATEL, V.V.; PATEL, S.; SAJEEV, B.C.D. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128: 325–331.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 7, p. 25-33, 2001.

VAN DEN BERG, C. 2008. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity*, 3: 3-12.

van den BERG C. 2014. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). *Phytotaxa* 186: 75-86.

VENTURA, Gizela Machado. Propagação in vitro de orquídeas do grupo *Cattleya*. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WATANABE, D.; MORIMOTO, M.S. Orquídeas: manual de cultivo. São Paulo: AOSP, 2007. 347p.

ZHANG, X. e t al. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile*. *Journal of Natural Products*, n 70, p. 24-28. 2007.