

ANDRÉIA ALINE FONTES

**DESINFESTAÇÃO QUÍMICA PARA SEMEIO E RECVLTIVO *IN VITRO* DE
ORQUÍDEAS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A NUTRIÇÃO DAS
PLÂNTULAS**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

F683d
2011

Fontes, Andréia Aline, 1984-

Desinfestação química para semeio e recultivo *in vitro* de
orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas /
Andréia Aline Fontes. – Viçosa, MG, 2011.
vii, 26f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Roberto Ferreira de Novais.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 21-23.

1. Orquídea. 2. Esterilização. 3. Plantas - Nutrição.
4. Orquídea - Propagação *in vitro*. 5. Água sanitária.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 584.4

ANDRÉIA ALINE FONTES

**DESINFESTAÇÃO QUÍMICA PARA SEMEIO E RECVLTIVO *IN VITRO* DE
ORQUÍDEAS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A NUTRIÇÃO DAS
PLÂNTULAS**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 07 de julho de 2011.



Prof. Wagner Campos Otoni



Prof. Victor Hugo Alvarez V.
(Coorientador)



Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Orientador)

À minha querida Mãe, Creuza, pelos ensinamentos, pelo incentivo e por toda dedicação e companheirismo.

Com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força em todos os momentos da vida.

Aos meus pais pelos ensinamentos e incentivos.

Ao meu marido, Bruno, pelo amor, compreensão e acima de tudo pela amizade.

Aos meus irmãos Cláudia e André, cunhados e sobrinhos pelo enorme carinho e torcida.

À minha família e amigos que sempre estiveram presente, mesmo distantes.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Roberto Ferreira de Novais pela orientação, dedicação e atenção ao longo deste valioso período.

Ao professor Victor Hugo pelos ensinamentos, paciência e carinho desde os tempos da graduação.

Ao professor Wagner Otoni pelo apoio e sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Solos que contribuíram para a construção do meu conhecimento.

Aos laboratoristas e amigos, Carlos Fonseca e José Quintão por todo esforço e dedicação.

Às estagiárias pelo apoio durante a pesquisa.

À Ecila por todos os conselhos, dicas e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos da Pós-graduação, Fran, Evair, Sandra, Gracinha, Fernandinha e Ingrid pela maravilhosa convivência.

Especialmente agradeço aos amigos que tenho como irmãos Nane, André e Marcus Locatelli que acreditaram, torceram pelo meu sucesso e muito me ajudaram. Pessoas com quem sempre pude compartilhar momentos de tristeza e de alegria.

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho!

Muito, Muito Obrigada!!!

BIOGRAFIA

ANDRÉIA ALINE FONTES, filha de Luiz Antônio Fontes e Creuza Ribeiro Fontes, nasceu em 01 de janeiro de 1984, em São Paulo, SP.

Em Julho de 2009, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Iniciou, em agosto de 2009, o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na mesma instituição, sob orientação do professor Roberto Ferreira de Novais, concluindo-o em julho de 2011.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
Experimento 1: Semeio.....	8
Experimento 2: Recultivo	13
CONCLUSÕES	20
LITERATURA CITADA	21
APÊNDICE	24

RESUMO

FONTES, Andréia Aline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.

Desinfestação química para semeio e recultivo *in vitro* de orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas. Orientador: Roberto Ferreira de Novais. Co-Orientador: Victor Hugo Alvarez V.

O uso de desinfestantes químicos como a água sanitária comercial (ASC) para esterilização dos meios de cultura para a propagação *in vitro* de orquídeas mostra-se uma técnica eficiente e de baixo custo em alternativa ao uso da autoclave e câmara de fluxo laminar (CFL). Todavia, algumas dúvidas sobre o tipo e volume de recipientes utilizados e o efeito sobre a nutrição das plântulas ainda persistem. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso da ASC na esterilização de meios de cultura para o semeio e recultivo de orquídeas, assim como avaliar o efeito deste em diferentes tipos de recipientes para o semeio e sobre o estado nutricional das plântulas recultivadas. No primeiro experimento, relativo ao semeio, foram utilizadas sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe, composto por um fatorial $(3 \times 5) + 3$, sendo: três tipos de recipientes (vidro com capacidade para 340 mL e polipropileno com capacidades para 140 e 340 mL); cinco concentrações da ASC aplicadas aos meios de cultura, 2, 5, 10, 20 e 40 mL L⁻¹; e três tratamentos controle, com autoclavagem dos meios e semeadura em condições de CFL, sem o uso da ASC, nos três recipientes. No segundo experimento (recultivo) foram utilizadas plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho. As doses de ASC adicionadas ao meio de cultura foram 2; 5; 10; 20; 30; 35 e 38 mL L⁻¹, e as doses pulverizadas sobre as plântulas no recultivo foram 5; 12,5; 25; 50; 75; 87,5 e 95 mL L⁻¹. O tratamento controle teve o meio autoclavado e o recultivo em condições de CFL. A proporção de sementes germinadas, sementes oxidadas e plântulas, assim como a matéria seca dos protocórmios foram maiores no tratamento controle. As crescentes doses da ASC adicionadas ao meio de cultura tiveram piores resultados na germinação nos recipientes de vidro em relação aos de polipropileno, entre os quais não houve diferenças de produção em relação às doses adicionadas. No recultivo, entre os frascos autoclavados e os esterilizados com a menor dose de ASC, não houve diferenças significativas entre as variáveis número de brotações, raízes e folhas, altura média e matéria seca. O aumento da dose de ASC influenciou negativamente o crescimento e exerceu pouca influência sobre o estado nutricional das plântulas.

ABSTRACT

FONTES, Andréia Aline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.

Chemical disinfection for sowing and reculture *in vitro* of orchids and its influence on seedling nutrition. Adviser: Roberto Ferreira de Novais. Co-adviser: Victor Hugo Alvarez V.

The use of chemical disinfectants such as commercial bleach (CB), for sterilization of culture medium for the propagation *in vitro* of orchids, is regarded as an efficient and low cost alternative technique compared to autoclave and laminar flow chamber (LFC). However, some questions concerning the type and volume of recipients to be used and the effect on seedling nutrition are yet to be answered. The purpose of this work was to evaluate the use of CB as means of sterilization of culture media for sowing and reculture of orchids, as well as evaluating its effect on different kinds of recipients for sowing and for the nutritional state of recultured seedling. In the first experiment, concerning the sowing, a *Laelia tenebrosa* Rolfe seed was used in a $(3 \times 5) + 3$ factorial scheme. Regarding the first experiment, three kinds of recipients (a glass recipient one with 340 mL capacity and a polypropylene one with 140 and 340 mL capacity); five doses of CB used in culture medium, 2, 5, 10, 20 e 40 mL L⁻¹; controlled treatment, by using autoclave in the culture medium and sowing in conditions of LFC without the use of CB in the three recipients. In the second experiment (reculture) seedlings of *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho were used. The doses of CB used in the culture medium were 2; 5; 10; 20; 30; 35 e 38 mL L⁻¹, and the doses pulverized over the recultured seedlings were, 5; 12,5; 25; 50; 75; 87,5 e 95 mL L⁻¹. The culture medium of the controlled treatment was autoclaved and reculture in LFC conditions. The proportion of germinated seeds, oxidized seeds, seedlings formed and the dry matter of protocorms were bigger in the controlled treatment. The higher doses of CB used in culture medium had worse results in the germination in glass recipient if compared to the polypropylene ones which had no difference in plant growth according to the dose applied. In the reculture, in respect to the autoclaved recipient and the sterilized ones with a lower CB concentration, there were no considerable differences between the number of sprouting, leafs and roots, mean height and dry matter mass. The increase in the CB dose negatively influenced the seedling growth and had little influence on its nutritional status.

INTRODUÇÃO

Entre as espécies de maior aceitação no mercado de flores, destacam-se as orquídeas, nos segmentos para corte e plantas em vasos (Kishor et al., 2006). Estas pertencem à família Orchidaceae, constituída por mais de 1.800 gêneros, cerca de 35.000 espécies e milhares de híbridos (Watanabe, 2002).

A propagação natural das orquídeas é extremamente baixa e demorada; apesar de seu fruto conter até um milhão de sementes, estas são extremamente pequenas e sem endosperma funcional, sendo que para germinar na natureza é necessária a associação simbiótica com fungos micorrízicos (Arditti, 1992).

Para atender à crescente demanda comercial a principal forma de produzir mudas de orquídeas é mediante a propagação *in vitro*, diminuindo assim a pressão de coleta, preservando-as em seu habitat natural (Rego-Oliveira & Faria, 2005). Este método proporciona grande número de mudas, em espaço e tempo reduzidos, de maneira economicamente viável.

Os meios nutritivos utilizados na propagação *in vitro* fornecem açúcares e nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Todavia, a presença desses componentes permite a fácil proliferação de fungos e bactérias que comprometem a germinação e o estabelecimento das mudas. A contaminação do meio de cultura é um dos maiores problemas na produção comercial de mudas *in vitro*, posto que os microrganismos competem pelos nutrientes no meio, além de produzirem substâncias fitotóxicas para as plântulas (Lima & Moraes, 2006).

Com o objetivo de obter mudas livres de patógenos, os laboratórios de cultura de tecidos investem em equipamentos caros, como a autoclave e a câmara de fluxo laminar. A técnica de autoclavagem, além de apresentar alto custo operacional, pode também danificar o meio de cultura. Em altas temperaturas ocorre à decomposição da sacarose com a formação do composto furfural, que é tóxico e impede o crescimento e desenvolvimento celular (Ribeiro et al., 2009).

Para os pequenos produtores e colecionadores de orquídeas, esses equipamentos são pouco acessíveis, devido ao custo elevado; todavia, pesquisadores têm buscado meios para simplificar esta técnica de cultivo *in vitro* como, por exemplo, o uso de panela de pressão, forno de micro-ondas (Teixeira et al., 2005) e desinfestantes químicos para esterilização do meio de cultura. Os desinfestantes químicos mais utilizados são o etanol e os compostos à base de Cl, como o

hipoclorito de sódio (NaClO) e de cálcio (Donini et al., 2005). Além destes, também há trabalhos que utilizaram dióxido de cloro (ClO₂) para produção de mudas de antúrio (Cardoso, 2009), peróxido de hidrogênio para esterilização de meios de cultura com explantes de *Lilium longiflorum* (Curvetto et al., 2006), com sementes (Snow, 1985) e explantes de orquídeas repicados (Yanagawa et al., 1995), dentre outros.

O emprego do NaClO, tendo como fonte água sanitária comercial (ASC) na esterilização de meios de cultura e desinfestação de sementes, mostra-se um método eficiente e de baixo custo como alternativa à autoclavagem e ao uso da câmara de fluxo laminar (Rodrigues, 2010), além de ser um produto de fácil aquisição.

Yanagawa et al. (1995) testaram a esterilização do meio de cultura para repicagem de explantes da espécie *Bletilla striata* e concluíram que a concentração de 0,105 g L⁻¹ de NaClO (3,57 mL L⁻¹ de ASC)⁽¹⁾, aplicados ao meio de cultura, e 5,24 g L⁻¹ de NaClO (178 mL L⁻¹ de ASC), aplicados sobre as mudas na forma de *spray*, não ocasionaram perda de crescimento das plântulas.

Alvarez-Pardo et al. (2006), estudando a influência do NaClO, variando a concentração (4,2 e 8,4 g L⁻¹) e o tempo de exposição (de 5 a 60 min), sobre a germinação de sementes de orquídeas, observaram que, aumentando-se a concentração e o tempo de exposição das sementes ao desinfestante químico, ocorreu redução na germinação. Apenas as espécies *Brassavola tuberculata*, *Cattleya intermedia* e *C. pallida intermedia* foram mais tolerantes aos efeitos da desinfestação. O tratamento com 4,2 g L⁻¹ de NaClO (143 mL L⁻¹ de ASC), por 5 min, mostrou-se, para a maioria das espécies, mais eficaz no controle da contaminação, com 87 % de germinação das sementes.

Outro aspecto a ser considerado sobre o uso de desinfestantes químicos em sementes e plântulas diz respeito ao efeito do NaClO sobre a nutrição das plantas. Entretanto, não foram encontradas referências que contemplassem essas informações.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o uso de NaClO, na forma de água sanitária comercial, na esterilização de meio de cultura para o semeio e recultivo *in vitro* de espécies de orquídeas, em dois experimentos. No primeiro experimento avaliou-se, o uso de diferentes tipos de frasco (frascos de vidro, com

⁽¹⁾ Para o cálculo da dose, entre parênteses, foi considerado o uso da ASC Candura[®] com concentração de 29,4 g L⁻¹ de NaClO.

capacidade para 340 mL, e de plástico, com capacidade para 140 e 340 mL) para o semeio de orquídeas e, no segundo experimento, avaliou-se o efeito do uso de doses crescentes de NaClO, adicionado ao meio de cultivo e pulverizado sobre as plântulas durante o recultivo, sobre o estado nutricional das plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese Experimental do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV): um avaliou o efeito do NaClO na fase de semeio e o outro na fase de recultivo.

O primeiro experimento (semeio) foi composto por um fatorial $(3 \times 5) + 3$, com cinco repetições, sendo os fatores: três frascos: um de vidro com capacidade para 340 mL (Vi_{340}), e dois de plástico com capacidades para 140 (Pl_{140}) e 340 mL (Pl_{340}); cinco concentrações de água sanitária comercial - Candura[®] (ASC) aplicadas ao meio de cultura, 2; 5; 10; 20 e 40 mL L⁻¹, equivalentes a 59; 147; 294; 589 e 1.176 mg L⁻¹ de NaClO; três tratamentos controle com autoclavagem dos meios e semeadura em condições de câmara de fluxo laminar, e sem o uso do desinfestante químico (método padrão), em três tipos de frasco. Foram utilizadas sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe. O experimento foi instalado segundo o delineamento experimental de blocos casualizados.

Foi realizada a análise da ASC utilizada, pelo método de Mohr (Vogel, 1992), e esta apresentou 29,4 g L⁻¹ de NaClO.

A vidraria utilizada para o preparo do meio de cultura foi enxaguada com ASC. O meio de cultura utilizado foi o meio S (Santos, 2009), constituído por 5 g L⁻¹ de sais do fertilizante B&G Orchidées[®] (2), 7 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]), 40 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de carvão ativado (Vetec[®]).

O meio de cultura foi preparado com o auxílio de um forno de micro-ondas, utilizado para dissolver os sais em solução, assim como para fundir o ágar. Posteriormente, o meio foi homogeneizado e a ASC adicionada ao meio de cultura ainda quente (60 °C); em seguida, o pH foi ajustado a 5,7. Foram adicionados 40 mL de meio de cultura em cada frasco. Os frascos de plástico foram tampados e os de vidro tiveram as tampas de polipropileno rígido rosqueadas, imediatamente, após o preenchimento desses com o meio.

O semeio foi realizado um dia após o preparo do meio de cultura. Para isto, foi utilizada uma seringa descartável com capacidade de 20 mL, onde as sementes e uma solução de ASC 100 mL L⁻¹ (2,9 g L⁻¹ de NaClO) ficaram em contato por 10

⁽²⁾ Informações sobre o fertilizante B&G podem ser encontradas no site: www.begflores.com.br

min. Em seguida, a ASC foi retirada e succionou-se água autoclavada, procedendo-se à lavagem das sementes. Posteriormente, essa suspensão de sementes foi transferida para um béquer (250 mL) contendo um agitador magnético, ambos esterilizados com ASC. Essa suspensão foi mantida em agitação, no interior da câmara de fluxo laminar, para manter-se livre de contaminação, simulando um ambiente estéril dentro de uma seringa. Adicionou-se, então, 1 mL desta suspensão por frasco com o auxílio de uma pipeta automática, de modo que o número de sementes por frasco fosse mais homogêneo. Imediatamente após o semeio, as bordas das tampas e frascos foram protegidas com filme transparente de PVC.

Para os tratamentos controle, em frascos de plástico, o meio de cultura foi autoclavado e, posteriormente, vertido nesses frascos no interior da câmara de fluxo laminar; aqueles para os tratamentos controle em frascos de vidro, autoclavou-se o meio de cultura dentro dos próprios frascos. As sementes utilizadas nos tratamentos controle foram desinfestadas com a mesma solução de ASC (10 % v/v) utilizada nos outros tratamentos.

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

A unidade experimental foi composta por um frasco contendo em média 590 sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe. As plântulas foram colhidas após quatro meses do semeio para avaliar: a proporção de sementes oxidadas (sementes e protocórmios que apresentavam coloração marrom), de sementes germinadas (soma das sementes oxidadas e das plântulas), de plântulas (protocórmios sem emissão de folhas e plântulas com uma ou duas folhas) e a massa de matéria fresca e seca das plântulas. A avaliação quanto à contaminação por fungos e bactérias foi realizada a cada dois dias, desde o semeio.

Para o segundo experimento (recultivo), foram utilizadas plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho cultivadas em frascos de vidro contendo o meio S, por seis meses. Por ocasião da repicagem, as plântulas apresentavam altura e massa de matéria fresca aproximadas de 0,5 cm e 40 mg, respectivamente. Soluções contendo ASC foram adicionadas aos meios de cultura durante o preparo deste, e pulverizadas sobre as mudas, durante o recultivo.

As concentrações de ASC adicionadas ao meio de cultura foram: 2; 5; 10; 20; 30; 35 e 38 mL L⁻¹ equivalentes a, respectivamente, 59; 147; 294; 589; 882; 1.029 e 1.117 mg L⁻¹ de NaClO; e as concentrações de ASC aplicadas na forma de *spray*,

sobre as mudas (repicadas) e na parte interna das tampas dos frascos, foram: 5; 12,5; 25; 50; 75; 87,5 e 95 mL L⁻¹ equivalentes a 147; 368; 735; 1.470; 2.205; 2.573 e 2.793 mg L⁻¹ de NaClO, respectivamente. No tratamento controle, o meio foi autoclavado e, posteriormente, vertido nos frascos de plástico em câmara de fluxo laminar; a repicagem das plântulas também ocorreu em condições de câmara de fluxo laminar.

Os tratamentos seguiram uma matriz Box Berard aumentada (3) modificada de acordo com Leite (1984), e com três tratamentos adicionais, totalizando 17 tratamentos (Quadro 1).

Quadro 1. Tratamentos segundo uma matriz Box Berard aumentada (3) modificada e com três tratamentos adicionais

Tratamento	ASC adicionada ao meio de cultura	ASC pulverizada sobre as plântulas
	mL L ⁻¹	
1 ⁽¹⁾	0	0
2	10	25
3	10	75
4	30	25
5	30	75
6	20	12,5
7	20	87,5
8	5	50
9	35	50
10	10	5
11	2	25
12	30	95
13	38	75
14	20	50
15	2	5
16	2	95
17	38	5

⁽¹⁾ Tratamento controle - autoclavado
ASC: água sanitária comercial

O recultivo das plântulas ocorreu um dia após o preparo do meio. O volume aplicado em forma de *spray* das soluções desinfestantes nas diversas concentrações por frasco foi de 0,5 mL e imediatamente após a aplicação os frascos foram fechados e as bordas protegidas com filme transparente de PVC. Após a repicagem, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 °C, irradiância de 48 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

Este experimento de recultivo foi montado em blocos casualizados, com seis repetições. A unidade experimental foi composta por um frasco de plástico de polipropileno com 140 mL de capacidade, cada um contendo 35 mL de meio de cultura e dez plântulas.

Os frascos foram avaliados a cada dois dias quanto à contaminação por fungos e bactérias e, após cinco meses, o experimento foi colhido e foram avaliadas as seguintes variáveis: altura média das plântulas, número de brotações, número de folhas e de raízes, massa de matéria seca das plântulas e relação entre massa de matéria seca da raiz e da parte aérea. As plântulas foram levadas à estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C, até peso constante, moídas em almofariz e submetidas à digestão sulfúrica e nítrico-perclórica para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, B, Mo e Cu, sendo o N total determinado pelo método Kjeldahl (Jackson, 1976) e os demais, por espectrofotometria de emissão em plasma induzido. Para obter-se a massa de matéria seca suficiente para as análises nutricionais, as repetições foram analisadas duas a duas, totalizando três repetições para estas análises.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, foram testados os seguintes contrastes:

Experimento 1: $C_1 = Vi_{340ASC} \text{ vs } Pl_{ASC}$, $C_2 = Pl_{140ASC} \text{ vs } Pl_{340ASC}$, $C_3 = Vi_{340A} \text{ vs } Vi_{340ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$, $C_4 = Pl_{140A} \text{ vs } Pl_{140ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$ e $C_5 = Pl_{340A} \text{ vs } Pl_{340ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$, em que: Vi_{ASC} e Pl_{ASC} representam todos os tratamentos que receberam a ASC nos frascos de vidro e plástico, respectivamente; Vi_{340A} , Pl_{140A} e Pl_{340A} são os tratamentos controle nos frascos de vidro com capacidade para 340 mL, de plástico com capacidade para 140 mL e 340 mL, respectivamente; $Vi_{340ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$, $Pl_{140ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$ e $Pl_{340ASC} (2 \text{ mL L}^{-1})$ são as menores doses de ASC adicionadas ao meio de cultura, respectivamente, no vidro de 340 mL, no plástico de 140 mL e 340 mL. Foram ajustadas curvas de resposta em função das doses de ASC para cada tipo de frasco utilizado.

Experimento 2: $C_1 = A \text{ vs } ASC$ e $C_2 = A \text{ vs } ASC (m=2 \text{ mL L}^{-1} \text{ e } p=5 \text{ mL L}^{-1})$, em que A é o tratamento controle (autoclavagem); ASC é a adição do desinfestante químico; m é a dose adicionada ao meio de cultura e p é a dose pulverizada sobre as plântulas. Foram ajustadas superfícies de resposta para as variáveis em estudo, em função das doses de ASC adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Semeio

A esterilização de meios de cultura com água sanitária comercial (ASC) mostrou-se eficiente no controle da contaminação. O número de frascos contaminados, com meio esterilizado com ASC, foi menor quando comparado ao tratamento controle (autoclavagem dos meios e semeio em câmara de fluxo laminar). Do total de 75 frascos esterilizados com ASC, apenas um contaminou; dos 15 frascos que receberam meios autoclavados, três contaminaram. Apesar da baixa contaminação, o uso do desinfestante químico mostrou-se fitotóxico para a germinação das sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Figura 1).

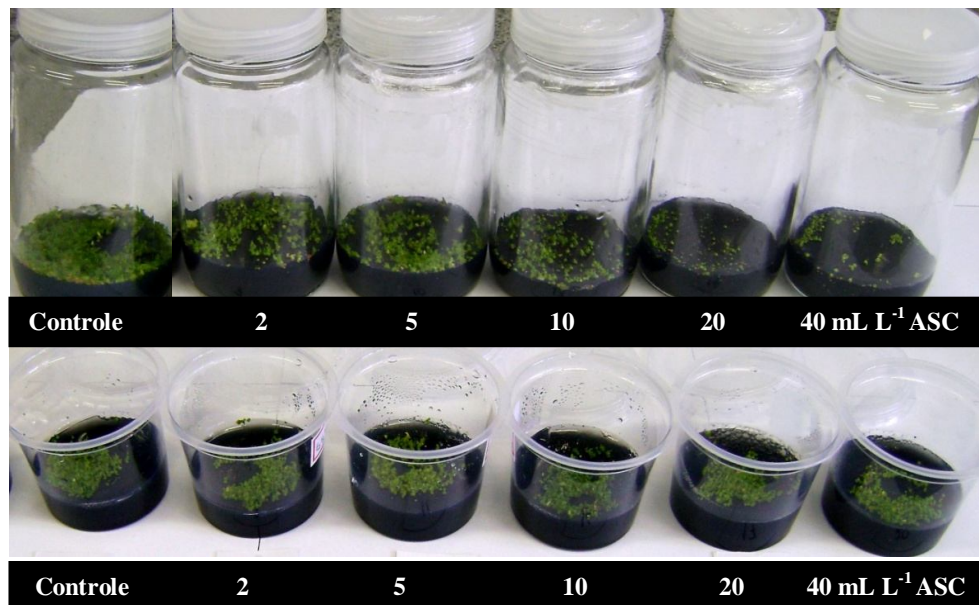


Figura 1. Efeito das doses de água sanitária comercial (ASC) adicionada ao meio de cultura, em recipientes de vidro e plástico, com capacidade para 340 mL, sobre a germinação e crescimento de sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe, aos quatro meses de idade.

As variáveis proporção de sementes germinadas e de plântulas, assim como a produção de matéria fresca e seca, foram estatisticamente maiores no tratamento controle, que passou pela autoclavagem (Figura 2). Em média, nos tratamentos que passaram pela autoclavagem obteve-se 85 % de germinação, enquanto que nos tratamentos desinfestados com a menor dose da ASC apenas 69 % das sementes germinaram (Figura 2B).

Yanagawa et al. (1995) tiveram sucesso na desinfestação de sementes de orquídeas com concentração de 5,24 g L⁻¹ de NaClO (178 mL L⁻¹ de ASC) aplicados na forma de *spray* sobre as sementes. Com as espécies *Bletilla striata*, *Cattleya loddigessi*, *Habenaria radiata* e híbridos do gênero *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, esses autores obtiveram 100 % de germinação; além disso, o meio de cultura não apresentou contaminação.

O aumento da dose de ASC adicionada ao meio de cultura apenas exerceu efeito tóxico sobre as sementes e protocórmios nos frascos de vidro; nos frascos de plástico não houve diferença de percentual de germinação e produção de matérias fresca e seca em relação à dose adicionada (Figura 2). Isto, provavelmente, deve-se à menor perda do Cl por volatilização nos recipientes de vidro, criando uma atmosfera interna com a permanência da ASC por mais tempo. O tipo de vedação das tampas nos frascos de plástico não limitou tanto as trocas gasosas como nos frascos de vidro, com tampas rígidas e rosqueáveis de polipropileno. Naqueles, houve um fechamento não completamente hermético em que as tampas são apenas encaixadas sobre os potes. Assim, devido à maior troca gasosa, o aumento da dose de ASC no meio não alterou o crescimento e o desenvolvimento dos protocórmios nos frascos de plástico.

Os resultados obtidos destacam a importância do tipo de recipiente utilizado, e por conseguinte a atmosfera interna dos mesmos, sobre o desempenho das culturas e sua relação com a efetividade da descontaminação química pela ASC. Na cultura de tecidos de várias espécies vegetais as respostas morfogênicas tem sido associadas à qualidade da atmosfera interna e ao volume livre de ar (*head space*) nos recipientes, ao tipo e tamanho de frascos e ao tipo de vedação (Demeester et al., 1995; Chen, 2004; Marino & Berardi, 2004; Zobayed, 2006; Gonçalves et al., 2008; Ribeiro et al. 2009).

Nos frascos de vidro, a proporção de sementes oxidadas apresentou resposta quadrática ao efeito de dose, com aumento da oxidação até a dose estimada de 15,75 mL L⁻¹ de ASC, com posterior decréscimo com o aumento da dose, evidenciando um comportamento quadrático (Figura 2A). A menor oxidação das sementes a partir desta dose ocorreu devido ao menor número de sementes germinadas, 52,18 %, sendo que com a maior dose de ASC (40 mL L⁻¹) obteve-se apenas 29 % de germinação. O aumento da dose de ASC exerceu efeito linear negativo sobre a germinação em recipientes de vidro, por razões já comentadas (Figura 2B).

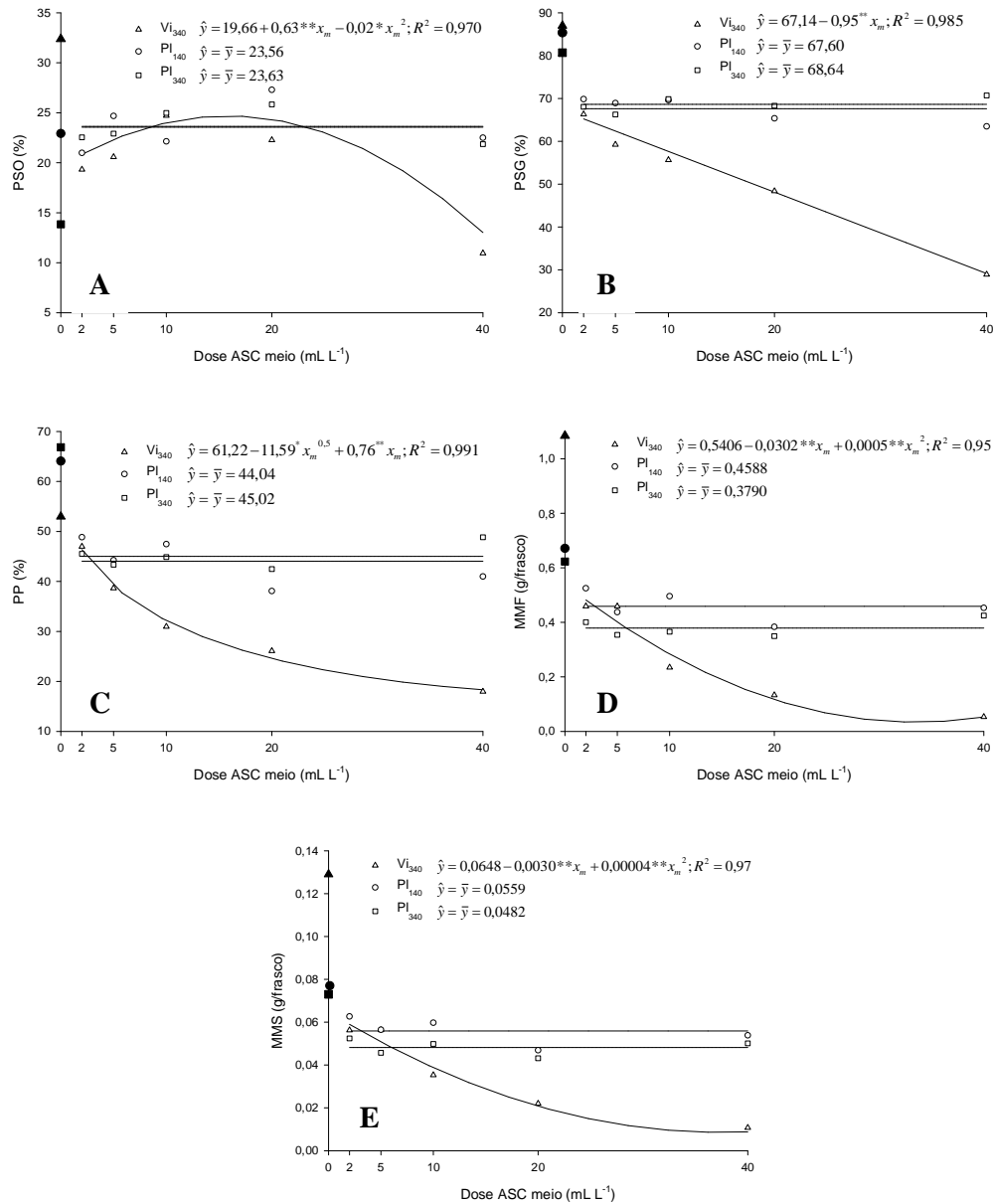


Figura 2. Efeito das doses de ASC adicionada ao meio de cultura, em diferentes frascos, sobre a proporção de sementes oxidadas - PSO (A), proporção de sementes germinadas - PSG (B), proporção de plântulas viáveis - PP (C), massa de matéria fresca - MMF (D) e massa de matéria seca - MMS (E) de *Laelia tenebrosa* Rolfe, aos quatro meses de idade [tratamentos controle no frasco de vidro (▲) e nos frascos de plástico com capacidades para 140 mL (●) e 340 mL (■)].

Rodrigues et al. (2011) encontraram resultados positivos para a germinação de *Cattleya intermedia* com o uso de ASC nas menores doses. Esse autor utilizou doses variando entre 1,2 e 4 800 mg L⁻¹ de NaClO (0,04 e 163 mL L⁻¹ ASC) e

verificou que o NaClO mostrou-se eficiente no controle da contaminação; contudo, o aumento da dose prejudicou a germinação das sementes.

Doses crescentes de ASC ocasionaram diminuição da proporção de plântulas viáveis para o recultivo e da produção de matéria fresca e seca de *Laelia tenebrosa* Rolfe. A menor e maior doses de ASC (2 e 40 mL L⁻¹) proporcionaram, respectivamente, 46,98 e 17,97 % de plântulas viáveis, 0,46 e 0,053 g/frasco e 56 e 11 mg/frasco de matéria fresca e seca, respectivamente (Figura 2C, D e E).

Com relação aos frascos de plástico de diferentes tamanhos, não houve diferença significativa para proporção de sementes oxidadas, de sementes germinadas e de plântulas viáveis. Apenas para produção de matéria fresca e seca das plântulas observou-se diferença significativa. Nos frascos de plástico com capacidade para 140 mL obtiveram-se, em média, respectivamente, 0,08 e 0,01 g/frasco de matéria fresca e seca a mais que nos frascos de plástico com capacidade para 340 mL (Quadro 2). Tais resultados são semelhantes aos encontrados por Moraes et al. (2010) para plântulas *Dendrobium nobile* Lind. cultivadas *in vitro*, que obtiveram maior produção de matéria fresca e seca nos frascos de 100 mL quando comparados aos de 200 e 400 mL.

Em relação aos frascos de plástico, aqueles maiores apresentaram menor tendência de condensação de água nas paredes dos recipientes e, ainda, maior perda de água do meio, diagnosticada pela retração do meio das paredes dos recipientes (observação visual). Segundo Pierik (1987), plântulas cultivadas em recipientes maiores apresentam maior superfície exposta de meio de cultura, sendo as plântulas submetidas a um ambiente mais seco, devido à maior entrada de luz e, por conseguinte, de calor. Esse autor ainda destaca que planta em recipientes maiores são mais susceptíveis à contaminação em relação aos recipientes menores.

A proporção de sementes oxidadas nos recipientes de vidro foi maior no tratamento controle. Em média, estes apresentaram mais sementes oxidadas (12,74 %) em relação ao tratamento com a menor dose de ASC (2 mL L⁻¹). Para os frascos de plástico com capacidade para 140 mL não foi observada diferença significativa na proporção de sementes oxidadas entre o tratamento controle e o tratamento com a menor dose de ASC. Por outro lado, nos frascos de plástico com capacidade para 340 mL, a oxidação foi maior com o uso da ASC (Figura 2A e Quadro 2). Esta variação quanto à oxidação das sementes deve-se, no caso dos frascos de vidro, provavelmente ao carvão ativado. O carvão ativado é adicionado ao

meio de cultura com o intuito de adsorver compostos tóxicos, como fenóis, produzidos pelas plantas, diminuindo a oxidação das sementes e dos protocórmios (Thomas, 2008). No tratamento controle, o meio de cultura foi autoclavado dentro dos frascos e, após o resfriamento do meio, o carvão ativado sofreu uma pequena decantação no fundo do frasco. Desta forma, a superfície que estava em contato com as sementes ficou com menos carvão ativado do que os meios que estavam nos recipientes de plástico, já que estes foram autoclavados em um erlenmeyer e o meio foi vertido nos frascos em câmara de fluxo laminar. Neste caso, o resfriamento do meio ocorreu mais rapidamente e o carvão não decantou como nos recipientes de vidro.

A proporção de sementes germinadas foi significativamente maior nos tratamentos controle nos frascos de vidro e de plástico de 140 mL, apresentando, respectivamente, 18,41 e 17,15 % mais sementes germinadas em relação aos recipientes com a menor dose de ASC. Para os recipientes de plástico de 340 mL não houve diferença significativa entre a germinação no tratamento controle e no tratamento com a menor dose de ASC. Em relação à proporção de plântulas viáveis, houve diferença significativa apenas para os recipientes de plástico, indicando maiores valores para o tratamento controle em relação à menor dose de ASC adicionada ao meio de cultura (Figura 2B, 2C e Quadro 2).

A análise dos contrastes mostrou que os frascos que receberam a ASC apresentaram germinação e produção de matéria fresca e seca maiores nos recipientes de plástico em relação aos de vidro, sendo a produção mais elevada nos recipientes de plástico menores quando comparados aos maiores (Quadro 2).

Quadro 2. Contrastes médios para as variáveis: proporção de sementes oxidadas (PSO), proporção de sementes germinadas (PSG), proporção de plântulas (PP), massa de matéria fresca (MMF) e massa de matéria seca (MMS) de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe, aos quatro meses de idade, submetidas à autoclavagem e diferentes doses de água sanitária adicionadas ao meio de cultura

Contrastes	PSO	PSG	PP	MMF	MMS
	%			g frasco ⁻¹	
C ₁	3,98 [*]	16,28 ^{**}	12,31 ^{**}	0,15 ^{**}	0,02 ^{**}
C ₂	0,17 ^{ns}	1,34 ^{ns}	1,16 ^{ns}	-0,08 [*]	-0,01 [*]
C ₃	-12,74 ^{**}	-18,41 ^{**}	-5,67 ^{ns}	-0,61 ^{**}	-0,07 ^{**}
C ₄	-1,93 ^{ns}	-17,15 [*]	-15,22 [*]	-0,15 [°]	-0,01 [°]
C ₅	10,54 [*]	-10,48 ^{ns}	-21,02 ^{**}	-0,19 [*]	-0,02 [*]

°, * e ** significativo pelo teste F a 10, 5 e 1 %, respectivamente.

C₁ = Vi_{340ASC} vs Pl_{ASC}, C₂ = Pl_{140ASC} vs Pl_{340ASC}, C₃ = Vi_{340A} vs Vi_{340ASC} (2 mL/L), C₄ = Pl_{140A} vs Pl_{140ASC} (2 mL/L) e C₅ = Pl_{340A} vs Pl_{340ASC} (2 mL/L).

Experimento 2: Recultivo

O uso de ASC como esterilizante químico em meio de cultura para o recultivo *in vitro* mostrou-se eficiente no controle da contaminação por fungos e bactérias. Não foi observada contaminação dos meios de cultura esterilizados com ASC, assim como no tratamento controle, com os meios autoclavados.

As doses crescentes de ASC adicionadas aos meios de cultura influenciaram negativamente o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho (Figura 3).

O modelo ajustado, raiz quadrática, para o número de emissões de novos pseudobulbos indica que a partir da dose estimada de 6,25 mL L⁻¹ de ASC houve efeito tóxico para as plântulas (Figura 4A).

Ribeiro et al. (2011) obtiveram meios de cultura sem contaminação microbiana utilizando concentrações entre 30 e 50 mg L⁻¹ de NaClO (1,02 e 1,70 mL L⁻¹ ASC), para o crescimento *in vitro* de *Sequoia sempervirens*. O aumento da concentração de NaClO proporcionou explantes com menor número de ramos. Os explantes cultivados em meio de cultura esterilizados com concentração entre 30 e 40 mg L⁻¹ NaClO (1,02 e 1,36 mL L⁻¹ ASC) apresentaram maior número de ramos, porém menor comprimento destes em relação ao meio de cultura autoclavado.

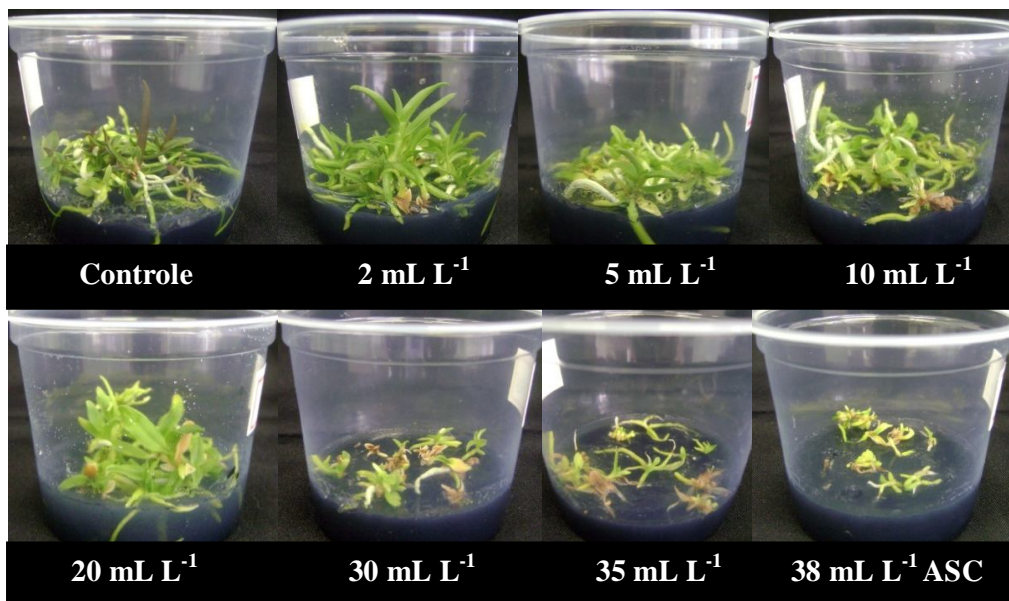


Figura 3. Efeito das doses de água sanitária comercial (ASC) adicionada ao meio de cultura, para a menor dose de ASC pulverizada durante o recultivo, sobre o crescimento de plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho após cinco meses de recultivo.

Para o número de raízes (NR) foram encontrados valores significativamente menores com o aumento da dose de ASC adicionada ao meio de cultivo. A menor dose de ASC (2 mL L^{-1}) proporcionou maior número de raízes, em média 60/frasco (Figura 4B), o que, a princípio, espera-se que estas absorvam mais nutrientes disponíveis no meio de cultura e apresentem maior crescimento.

Com o incremento nas doses de ASC, registrou-se aumento na massa de matéria seca de parte aérea até a concentração estimada de $9,92 \text{ mL L}^{-1}$ (78 mg/frasco), a partir da qual verificou-se redução (51 mg/frasco) até a dose máxima utilizada (38 mL L^{-1}) (Figura 4C).

Em termos de produção de matéria seca de raízes e matéria seca total (parte aérea mais raízes), foram encontradas respostas lineares negativas, ao efeito de doses, sendo as maiores produtividades estimadas iguais a 0,141 e 0,218 g/frasco, para matéria seca de raízes e total, respectivamente (Figuras 4D e E). A menor dose de ASC adicionada ao meio de cultura foi responsável por esta maior produção.

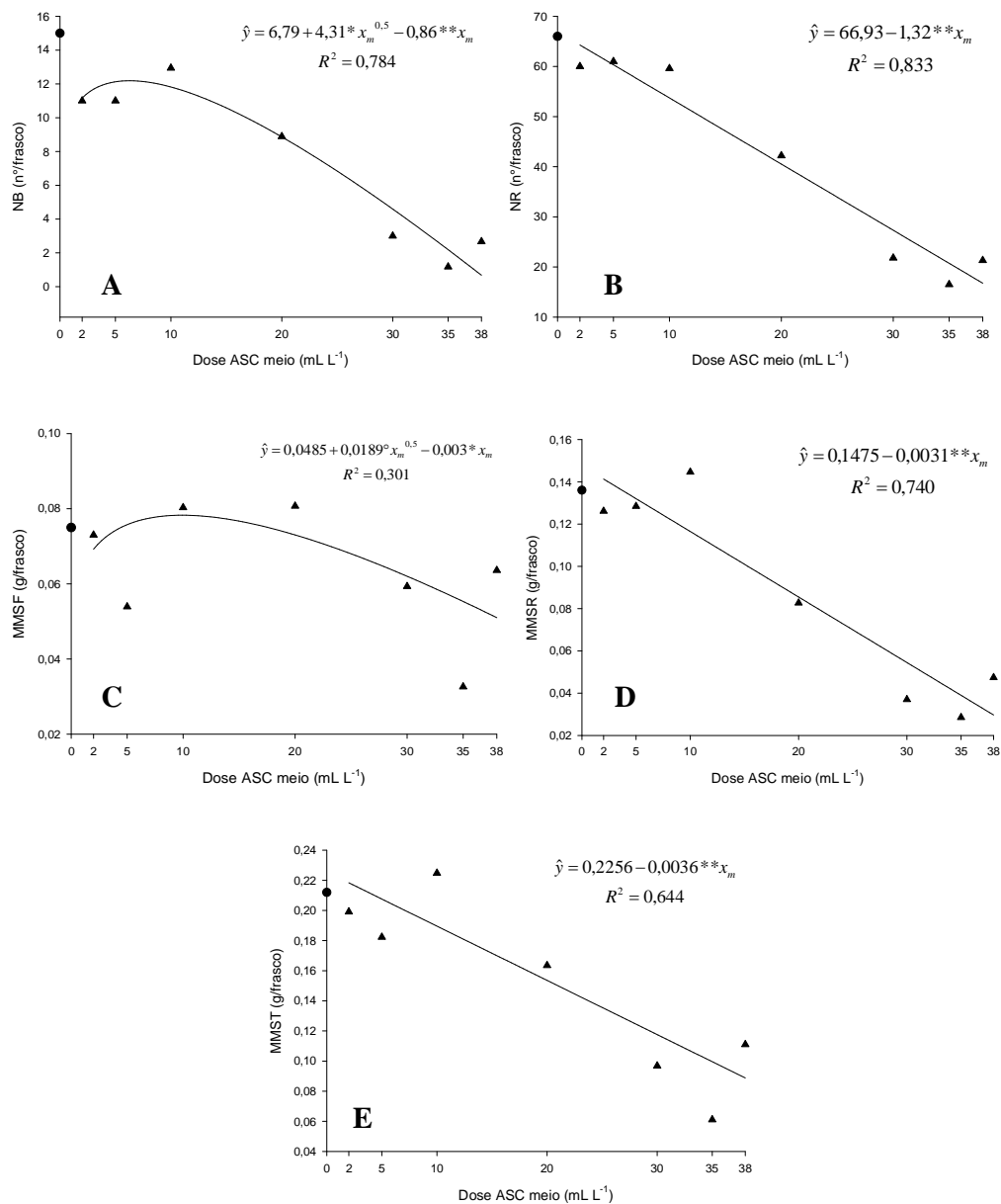


Figura 4. Número médio de brotações- NB (A), número de raízes- NR (B), massa de matéria seca de folhas- MMSF (C), massa de matéria seca de raízes- MMSR (D) e massa de matéria seca total- MMST (E) de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho por frasco como variável de doses crescentes de água sanitária comercial (ASC) adicionada ao meio de cultura (X_m) e para média das doses de ASC pulverizada sobre as plântulas após cinco meses de recultivo [Controle (●) e ASC (▲)].

A pulverização da ASC sobre as plântulas resultou em necrose parcial em algumas folhas que receberam essa solução. Quanto maior a dose pulverizada, maior a severidade necrótica nas folhas, levando algumas plântulas à morte; porém, as plântulas que sobreviveram com o passar do tempo, produziram novas folhas. As variáveis de crescimento de parte aérea, como a altura média das plântulas e o número de folhas por frasco, foram influenciadas pela pulverização com ASC (Figura 5). O aumento da dose de pulverização resultou em menores valores para estas variáveis (Figuras 6A e B). Estes resultados condizem com os obtidos por Rodrigues (2010) que verificou que o comprimento, a produção de matéria fresca e o número de brotos de *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum ibaguenses* foram reduzidos com o aumento da dose de ASC aplicada em forma de spray sobre os segmentos nodais.

A relação massa de matéria seca de raiz e de parte aérea (R/PA) diminuiu com o aumento da concentração de ASC no meio de cultura, demonstrando um efeito fitotóxico do produto à produção de raízes, como já comentado (Figura 6C).

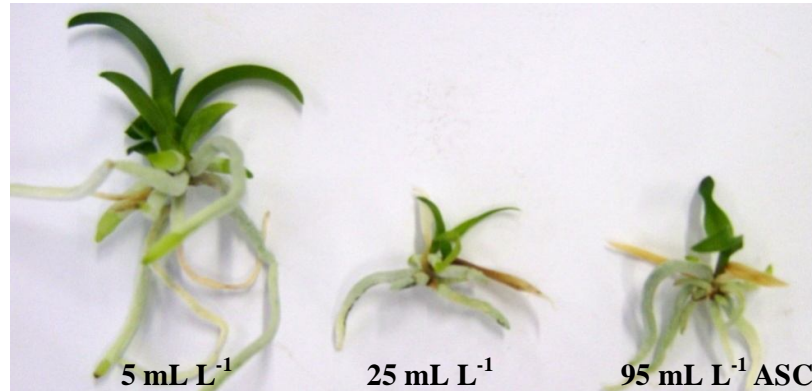


Figura 5. Efeito das doses crescentes de água sanitária comercial (ASC) pulverizada sobre as plântulas durante o recultivo, em meios de cultura com adição de 2 mL L^{-1} ASC, sobre o crescimento de plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho após cinco meses de recultivo.

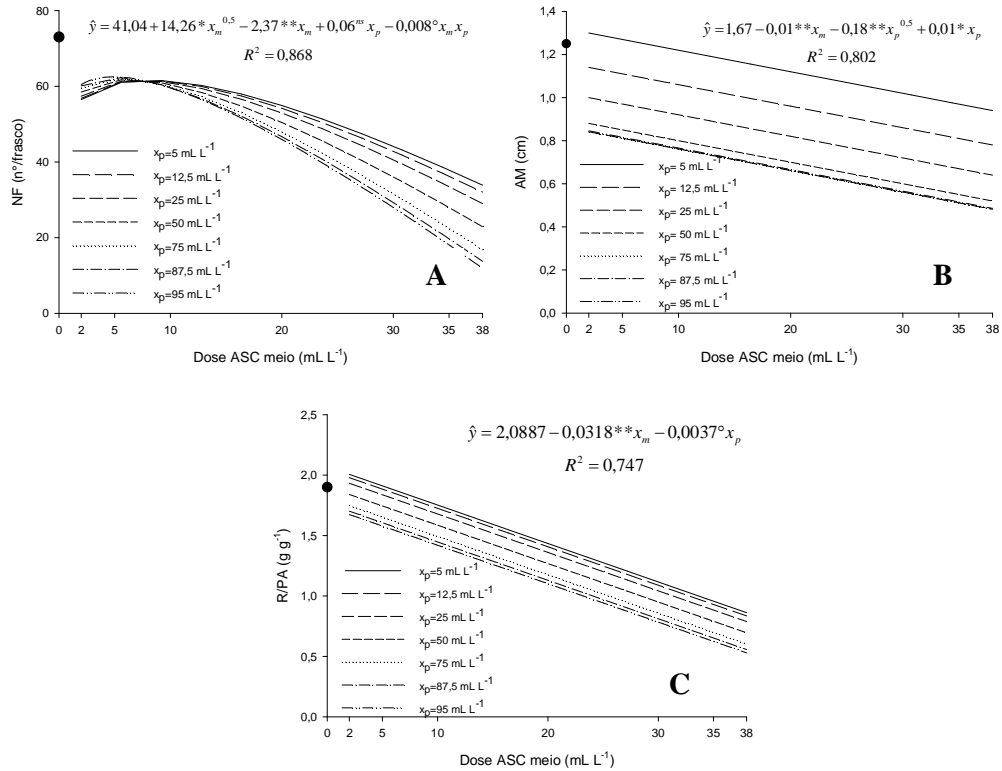


Figura 6. Número de folhas - NF (A), altura média - AM (B) e relação entre a produção de matéria seca de raízes e parte aérea - R/PA (C) de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho por frasco como variável de doses crescentes de água sanitária comercial (ASC) adicionada ao meio de cultura (X_m) e de doses de ASC pulverizada sobre as plântulas durante o recultivo (X_p) [Controle (●)].

A análise dos contrastes mostrou que não houve diferença significativa, para as variáveis avaliadas, entre os frascos com meio de cultura autoclavado e os esterilizados com a menor dose de ASC adicionada ao meio de cultura, durante o preparo ou pulverizada sobre as plântulas, durante o recultivo. Quando os meios autoclavados foram contrastados com os meios que receberam doses crescentes de ASC, diferenças significativas foram observadas entre as variáveis avaliadas, indicando que as plântulas cresceram mais quando cultivadas em meio de cultura autoclavado. Provavelmente, esse resultado esteja refletindo a toxicidade das maiores doses de ASC adicionadas, ocasionando menor crescimento das plântulas (Quadro 3).

Quadro 3. Contrastes médios para as variáveis: altura média (AM), número de brotações (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa de matéria seca de folhas (MMSF), massa de matéria seca de raízes (MMSR) e massa de matéria seca total (MMST) de plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, submetidas à autoclavagem e diferentes doses de água sanitária, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

Contrastes	AM	NB	NF	NR	MMSF	MMSR	MMST	R/F
	— cm —	— n°/frasco —			— g/frasco —			
C ₁	-0.30*	-7.0**	-26,03**	-24,35**	-0,007 ^{ns}	-0,047°	-0,054 ^{ns}	-0.542°
C ₂	0.26 ^{ns}	-4.0 ^{ns}	-11,50 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,011 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,028 ^{ns}	-0.095 ^{ns}

°, * e ** significativo pelo teste F a 10, 5 e 1 %, respectivamente.

C₁ = A vs. ASC e C₂ = A vs. ASC (M=2 mL/L e P=5 mL/L).

A partir da análise dos teores médios dos nutrientes nas plântulas, após cinco meses de recultivo, observou-se que o uso da ASC, em menores doses, resulta em plântulas mais bem nutridas (maiores teores) em relação às cultivadas em meio de cultura autoclavado. Observou-se que os meios de cultura autoclavados apresentaram consistência mais firme quando comparados aos meios com adição de ASC. Aparentemente as plântulas cultivadas em meio de cultura com a menor dose de ASC puderam explorar mais eficientemente o meio de cultura e, conseqüentemente absorver mais nutrientes. O aumento da dose de ASC levou a produção de plântulas com sistema radicular menor, desta forma estas absorveram menos água e nutrientes (Quadro 4).

De acordo com os contrastes pode-se inferir que para a maioria dos nutrientes os teores foram significativamente maiores nas plântulas cultivadas em meio de cultura esterilizado com a menor dose de ASC em relação ao meio autoclavado (Quadro 5). Quando se contrastou o tratamento controle (meio autoclavado) com todos os tratamentos com meio de cultura esterilizado quimicamente, novamente, para a maioria dos nutrientes, os teores foram maiores em plântulas cultivadas em meio com ASC. Possivelmente, a maior produção em meio autoclavado em comparação aos meios com maiores doses de ASC tenha provocado um efeito de diluição dos nutrientes nas plântulas (Marschner, 1995).

Quadro 4. Teores dos nutrientes em plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, submetidas à autoclavagem e diferentes doses de água sanitária, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

ASC meio	ASC pulv.	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Mo
mL L ⁻¹		g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹					
Controle		20,2	4,9	24,9	9,9	2,7	5,0	91,3	6,9	109,4	87,3	66,1	0,2
10	25	19,6	5,7	26,4	9,1	3,0	6,7	68,3	9,1	63,4	97,9	71,9	0,9
10	75	17,8	5,8	26,1	9,2	3,0	6,2	61,3	8,5	76,0	94,4	71,0	0,5
30	25	11,4	4,8	17,6	8,0	2,8	7,0	81,3	12,2	44,0	80,4	75,3	0,2
30	75	11,5	5,4	18,5	9,0	3,2	7,3	76,2	14,1	81,5	94,1	78,2	0,4
20	12,5	16,9	5,7	25,0	10,3	3,2	6,5	67,5	10,8	93,7	94,2	73,6	0,9
20	87,5	16,3	5,0	19,9	8,5	2,7	6,2	78,6	9,9	76,5	82,4	44,6	0,9
5	50	15,3	4,1	18,6	8,1	2,6	4,2	81,9	5,6	70,4	61,0	66,6	0,2
35	50	10,4	4,7	20,0	11,0	3,1	7,6	112,9	7,2	71,8	99,8	95,5	1,1
10	5	22,2	6,4	29,4	9,5	3,1	6,3	63,3	9,5	87,8	94,2	80,2	0,7
2	25	25,4	6,9	32,7	8,4	3,2	7,0	61,6	11,3	84,0	101,3	84,3	0,8
30	95	(¹)	5,2	18,0	9,9	3,2	8,0	108,1	13,7	60,1	92,4	88,2	0,5
38	75	14,9	6,1	24,4	8,2	2,8	11,9	99,6	13,3	49,0	98,3	97,1	2,3
20	50	17,1	5,6	24,6	9,6	3,1	6,5	66,6	11,4	79,8	92,8	82,3	0,7
2	5	26,0	7,1	32,5	9,2	3,3	6,6	68,5	11,8	112,9	123,7	81,0	0,7
2	95	24,5	7,3	31,0	9,7	3,3	7,4	73,6	12,3	107,9	123,2	89,1	0,7
38	5	16,4	6,7	26,3	9,7	2,9	8,2	79,0	10,4	87,5	130,4	81,4	1,6

(¹) Não houve quantidade de matéria seca necessária para realizar a análise.

Quadro 5. Contrastes médios para os teores de macro e micronutrientes das plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, submetidas à autoclavagem e diferentes doses de água sanitária adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

	N	Ca	S	Mg	K	P	Mn	Zn	Fe	B	Mo	Cu
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹					
C ₁	-2,54**	-0,65 ^{ns}	2,16*	0,35*	-0,43 ^{ns}	0,87*	10,3 ^{ns}	-31,6**	-13,3 ^{ns}	12,7 ^{ns}	0,6**	3,8**
C ₂	5,76**	-0,62 ^{ns}	1,69 ^{ns}	0,63*	7,64**	2,23**	36,5*	3,4 ^{ns}	-22,8 ^o	14,9 ^{ns}	0,5*	4,9**

^o, * e ** significativo pelo teste F a 10, 5 e 1 %, respectivamente.

C₁ = A vs. ASC e C₂ = A vs. ASC (M=2 mL/L e P=5 mL/L).

CONCLUSÕES

1. A água sanitária comercial (ASC), como desinfestante químico, mesmo na menor concentração, mostra-se eficiente para o controle da atividade microbiana em meios de cultura.
2. A ASC exerce efeito fitotóxico sobre a germinação de *Laelia tenebrosa* Rolfe, porém seu uso na menor dose testada, adicionada ao meio de cultura e pulverizada sobre as plântulas durante o recultivo, mostra-se tão eficiente quanto ao uso da autoclave e câmara de fluxo laminar.
3. Doses crescentes de ASC exercem efeito tóxico sobre as plântulas cultivadas em recipientes de vidro, enquanto que em recipientes de plástico não é evidenciado este efeito.
4. A ASC exerce pouca influência sobre o estado nutricional das plântulas.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G. & NUNES, V.F. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. Hort. Bras., 24:217-220, 2006.
- ARDITTI, J. Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- CARDOSO, J.C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. Pesq. Agropec. Bras., 44:785-788, 2009.
- CHEN, C. Humidity in plant tissue culture vessels. Biosyst. Engin., 88:231-241, 2004.
- CURVETO, N.; MARINANGELI, P. & MOCKEL, G. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology. Biocell, 30:497-500, 2006.
- DEMEESTER, J.J.; MATTHIJS, D.G.; PASCAT, B. & DEBERGH, P.C. Toward a controllable headspace composition - Growth, development, and headspace of a micropropagated *Prunus* rootstock in different containers. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 31:105-112, 1995.
- DONINI, L.P., FERREIRA-MOURA, I., GUISSO, A.P., SOUZA, J.A. & VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: Desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Arq. Inst. Biol., 72: 517-522, 2005.
- GONÇALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; CARVALHO, C.R. & OTONI, W.C. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. Plant Cell. Tiss. Organ Cult., 92:243-250, 2008.
- JACKSON, M.L. Soil chemical analysis. Advanced course. 2.ed. Madison, 1979. 895p.
- KISHOR, R.; KHAN P.S.S.V. & SHARMA, G.J. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid Ascocenda 'Kangla'. Sci. Hort, 108:66-73, 2006.
- LEITE, R.A. Uso de matrizes experimentais e de modelos estatísticos no estudo do equilíbrio fósforo-enxofre na cultura de soja em amostras de dois Latossolos de Minas Gerais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1984, 87p. (Dissertação de Mestrado)
- LIMA, J.D. & MORAES, W.S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. caipira). Pesq. Agrop. Trop., 36:181-186, 2006.
- MARINO, G. & BERARDI, G. Different sealing materials for Petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 40:384-388, 2004.

- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1995. 889p.
- MORAES, C.P.; DIOGO, J.A.; CANABRAVA, R.I.; PEDRO, N.P.; FURTADO, A.L.F. & MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lind. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. R. Bras. Bioci., 8:225-228, 2010.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants: closure of test tubes and flasks. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing. 1987. 344p.
- REGO-OLIVEIRA, L.V. & FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Act. Sci. Agron, 27:1-5, 2005.
- RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A. & OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 45:421-428, 2009.
- RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, S.L. & BASTOS, D.B. Cultivo *in vitro* de *Sequoia sempervirens* L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. Ci. Flor., 21:77-82, 2011.
- RODRIGUES, D.T. Propagação *in vitro* de orquídeas sem a utilização de câmara de fluxo laminar. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2010, 50p. (Tese de Doutorado)
- RODRIGUES, D.T.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; DIAS, J.M.M.; VILLANI, E.M.A. & OTONI, W.C. *In vitro* germination of *Cattleya intermedia* R. Graham by means of chemical disinfection and without laminar flow. Prop. Ornam. Plants, 11:119-124, 2011.
- SANTOS, A.F. Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* × self. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2009, 24p. (Dissertação de Mestrado)
- SNOW, R. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. Am. Orch. Soc. Bull., 54:178-181, 1985.
- TEIXEIRA, S.L.; SOUZA, R.T.S. & TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. R. Ceres, 52:499-507, 2005.
- THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol. Adv., 26:618-631, 2008.
- VOGEL, A.I. Análise química quantitativa. 5. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 712p.
- WATANABE, D. Orquídeas: Manual de cultivo. São Paulo, Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. 296p.

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

ZOBAYED, S.M.A. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S. & IBARAKI, Y. (eds.) *Plant tissue culture engineering*. Springer, Netherlands. p. 313-327, 2006.

APÊNDICE

Quadro 1A. Análise de variância para as variáveis: proporção de sementes oxidadas (PSO), proporção de sementes germinadas (PSG), proporção de Pântulas (PP), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) em *Laelia tenebrosa*, como variáveis de doses de ASC adicionadas ao meio de cultura e autoclavagem (tratamento controle), aos quatro meses de idade

FV	GL	Quadrado Médio				
		PSO	PSG	PP	MF	MS
Bloco	4	256.77**	215.2 ^{ns}	382.1**	0,0483*	0,0004*
Tratamento	17	99.50**	803.9**	606.0**	0,2059**	0,0025**
Resíduo	64	40.48	109.3	84.2	0,0159	0,0001
CV (%)		28.34	15.92	21.23	29,51	22,68

* e **, significativo pelo teste F a 5,0 e 1 %, respectivamente.

Quadro 2A. Média dos resultados das variáveis: altura média (AM), número de brotações (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa de matéria seca de folhas (MMSF), massa de matéria seca de raízes (MMSR) e massa de matéria seca total (MMST) de plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, submetidas à autoclavagem e diferentes doses de água sanitária, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

Dose ASC meio	Dose ASC pulv	AM	NB	NF	NR	MMSF	MMSR	MMST	R/PA
mL L ⁻¹		cm	- n°/frasco -			g/frasco		g g ⁻¹	
controle		1,25	15	73	66	0,075	0,136	0,212	1,9
10	25	0,89	15	67	57	0,085	0,140	0,225	1,5
10	75	0,92	15	69	67	0,092	0,164	0,256	1,6
30	25	0,83	2	34	18	0,058	0,033	0,091	0,7
30	75	0,93	5	35	29	0,066	0,056	0,122	1,2
20	12,5	0,97	10	54	44	0,082	0,094	0,176	1,3
20	87,5	1,01	5	42	33	0,073	0,070	0,143	1,1
5	50	0,98	11	54	61	0,054	0,128	0,182	2,3
35	50	0,67	1	21	17	0,033	0,029	0,061	0,9
10	5	1,19	9	57	56	0,064	0,130	0,193	2,1
2	25	1,07	10	54	52	0,057	0,101	0,158	1,8
30	95	0,72	3	28	18	0,056	0,022	0,078	0,4
38	75	0,72	2	24	12	0,053	0,021	0,074	0,7
20	50	0,85	12	58	50	0,086	0,085	0,171	1,0
2	5	1,51	11	62	67	0,087	0,153	0,240	1,8
2	95	1,02	13	61	61	0,075	0,124	0,199	1,7
38	5	0,85	3	39	31	0,074	0,074	0,148	1,1

Quadro 3A. Análise de variância para as variáveis: altura média (AM), número de brotações (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), massa de matéria seca de folhas (MSF), massa de matéria seca de raízes (MSR), massa de matéria seca total (MST) e relação raiz parte aérea (R/F) em *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, como variáveis de doses de ASC, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

FV	GL	Quadrado Médio							
		AM	NB	NF	NR	MSF	MSR	MST	R/PA
Bloco	5	0,25*	56,06 ^{ns}	278,34 ^{ns}	2416,12 ^{**}	0,0009 ^{ns}	0,0325 ^{**}	0,0322 ^{**}	7,80 ^{**}
Tratamento	16	0,26 ^{**}	145,60 ^{**}	1600,92 ^{**}	2294,00 ^{**}	0,0015 ^{ns}	0,0137 ^{**}	0,0212 ^{**}	1,67 ^{**}
Resíduo	80	0,08	32,85	331,50	383,73	0,0010	0,0036	0,0073	0,45
CV (%)		29,03	68,61	37,20	45,06	46,63	65,77	53,34	49,55

* e **, significativo pelo teste F a 5,0 e 1 %, respectivamente.

Quadro 4A. Análise de variância para teores de N em plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, como variáveis de doses de ASC, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

FV	GL	Quadrado Médio
Bloco	2	2,06 ^{ns}
Tratamento	15	70,97 ^{**}
Resíduo	30	0,94
CV (%)		5,44

**, significativo pelo teste F a 1 %.

Quadro 5A. Análise de variância para teores de macro e micronutrientes em plântulas de *Cattleya kerri* Brieger & Bicalho, após cinco meses de recultivo, como variáveis de doses de ASC, adicionadas ao meio de cultura e pulverizadas sobre as plântulas

FV	GL	Quadrado Médio										
		Ca	S	Mg	K	P	Mn	Zn	Fe	B	Mo	Cu
Bloco	2	0,01 ^{ns}	37,63 ^{**}	0,39 [°]	8,06 ^{ns}	1,55 [*]	505,28 ^{ns}	254,93 ^{ns}	755,52 [°]	1166,02 ^{**}	0,20 ^{ns}	5,58 ^{ns}
Tratamento	16	2,06 [*]	7,78 ^{**}	0,15 ^{ns}	76,82 ^{**}	2,61 ^{**}	842,88 [*]	1154,80 ^{**}	749,13 ^{**}	465,34 ^{**}	0,85 ^{**}	17,97 ^{ns}
Resíduo	32	0,94	1,86	0,12	5,43	0,44	399,57	207,77	243,65	168,37	0,08	1,73
CV (%)		10.49	19.55	11.52	9.52	11.58	20.62	18.07	19.81	16.63	35.89	12.56

°, * e **, significativo pelo teste F a 10; 5,0 e 1 %, respectivamente.