

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA**

ISABELA CORDEIRO GUEDES

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA PARA
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Hoffmannseggella caulescens* (ASPARAGALES:
ORCHIDACEAE).**

SÃO JOÃO EVANGELISTA, MG

2018

ISABELA CORDEIRO GUEDES

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA PARA
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Hoffmannseggella caulescens*, (ASPARAGALES:
ORCHIDACEAE)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São
João Evangelista como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Me. Fernanda Lima Barroso

SÃO JOÃO EVANGELISTA, MG

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

G924d
2018 Guedes, Isabela Cordeiro.

Destinação Esterilização química do meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Hoffmannseggella Caulescens*, (Asparagales: Orchidaceae). / Isabela Cordeiro Guedes. – 2018.
21f.; il

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2018.

Orientadora: Profª. Me. Fernanda De Lima Barroso

1. Cultura de tecidos. 2. Esterilização química. 3. Produção de mudas.
I. Guedes, Isabela Cordeiro. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 660.6

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais
Campus São João Evangelista

Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

ISABELA CORDEIRO GUEDES

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA PARA
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Hoffmannseggella caulescens*,
(ASPARAGALES: ORCHIDACEAE).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus
São João Evangelista como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientadora: Me. Fernanda Lima Barroso.

Aprovada em 20 / 10 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

FZBarroso

Orientadora Profª. Me. Fernanda Lima Barroso
Instituto Federal de Minas Gerais

Alisson J. E. de Carvalho

Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho
Instituto Federal de Minas Gerais

Ari Neto

Me. Ari Medeiros Braga Neto
Instituto Federal de Minas Gerais

Á Deus, o dono de todo amor e superação que existe
em minha vida. O amor verdadeiro, incondicional e
sem medidas.

Á todos que acreditaram em mim e estiveram
presente em cada vitória.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu força e resignação para passar por todos os obstáculos, proporcionando coragem para seguir em frente e vencer os desafios da vida.

Agradeço à minha mãe Berenice que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade e a minha irmã Sabrina.

Agradeço à minha família de coração Wilson, Eliane, Iury, Ian, Fabricia e Yasmim que me apoiaram com pequenas palavras e gestos ao longo deste percurso e que sempre foram amorosos e atenciosos em cada dificuldade e conquista. Esta vitória também é de vocês, por me proporcionar momentos alegres e renovadores.

Ao meu namorado, Lucas, que me acompanhou nessa trajetória com todo apoio e carinho, agradeço pelo companheirismo e pelo crescimento juntos.

As minhas colegas mais que especiais de turma e da vida, Roberta e Simone. Vocês sempre estarão em meu coração. Obrigada por tudo que me proporcionaram.

Aos meus eternos amigos, Guilherme, Luiz Otávio e Shayane. Vocês foram à demonstração do amor de Deus em minha vida nestes anos.

A todos os professores do curso de Bacharelado em Agronomia do IFMG-SJE.

Obrigada especialmente ao servidor Paulo Modesto Campos, que me motivou a persistir e seguir em frente sempre. Seus ensinamentos no laboratório e seu exemplo de profissional e ser humano vou com certeza levar para sempre em minha vida.

Aos meus orientadores de projetos Dr. Victor Dias Pirovani e o Dr. José Roberto de Paula. Obrigada pela oportunidade de orientação em projetos de pesquisas que foi imprescindível em minha formação.

A minha orientadora Me. Fernanda Lima Barroso, por sua paciência, dedicação e incentivo incondicional na orientação, fazendo-me acreditar que sempre podemos mais.

A aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a concretização desse trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – campus São João Evangelista pelo apoio estrutural e logístico para o desenvolvimento do presente trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King).

RESUMO

Existe uma crescente demanda na produção de plantas ornamentais. Com o intuito de suprir essa necessidade, vários laboratórios investem em equipamentos caros, com a finalidade de fornecer aos consumidores mudas de orquídeas com mais eficiência, alta qualidade fitossanitária, porém com um alto valor agregado devido ao elevado custo de produção. Um dos equipamentos mais caros utilizados neste processo é a autoclave, utilizada para esterilizar vidrarias e meio de cultura. A fim de diminuir os custos deste processo, este trabalho tem como finalidade utilizar uma esterilização alternativa neste meio de cultura, testando diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (NaClO), tendo como fonte Água Sanitária Comercial (ASC), sendo o mesmo um método eficiente e de baixo custo. Dessa forma, foram realizados ensaios para testar diferentes concentrações de NaClO na esterilização de *Hoffmannseggella caulescens*: T1 – 0,0 mL.L⁻¹ (Testemunha); T2 – 5,0 mL.L⁻¹; T3 – 10,0 mL.L⁻¹; T4 – 15,0 mL.L⁻¹ e T5 – 20,0 mL.L⁻¹. As sementes da orquídea foram inoculadas em meio de cultura contendo NaClO, tendo como fonte ASC, sendo também testado a eficiência da água deionizada/autoclavada e água destilada no preparo do meio de cultura, com o objetivo de verificar qual a influência de ambas na contaminação do meio de cultura. Diante disso, foi avaliada contaminação, germinação e crescimento *in vitro* da espécie. Através dos resultados, pode-se constatar que, doses crescentes de NaClO adicionadas ao meio de cultura tiveram resultados negativos para germinação de plântulas *Hoffmannseggella caulescens*, tendo como melhor dosagem 10 mL.L⁻¹ de NaClO, havendo neste 100% de germinação. Esta dosagem também se mostrou eficiente no controle microbiano. O uso de água autoclavada em comparação com água destilada mostrou-se mais eficiente no controle microbiano. Na adoção de água autoclavada houve também um percentual maior de germinação das sementes de *Hoffmannseggella caulescens*. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade de dispensar o uso da autoclave para a esterilização de meios de cultura na concentração de 10 mL.L⁻¹ de NaClO para a germinação de *Hoffmannseggella caulescens*.

Palavras-chaves: Cultura de tecidos. Esterilização química. Produção de mudas.

ABSTRACT

There is a growing demand in the production of ornamental plants. In order to meet this need, several laboratories invest in expensive equipment, in order to provide consumers with orchid seedlings with more efficiency, high phytosanitary quality, but with a high added value due to the high cost of production. One of the most expensive equipment used in this process is the autoclave, used to sterilize glassware and culture medium. In order to reduce the costs of this process, this work intends to use an alternative sterilization in this culture medium, testing different concentrations of Sodium Hypochlorite (NaClO), with Commercial Sanitary Water (ASC) as an efficient method and low cost. Thus, assays were performed to test different concentrations of NaClO in the sterilization of *Hoffmannseggella caulescens*: T1 - 0,0 mL.L⁻¹ (Witness); T2 - 5.0 mL.L⁻¹; T3 - 10.0 mL.L⁻¹; T4 = 15.0 mL.L⁻¹ and T5 - 20.0 mL.L⁻¹. The seeds of the orchid were inoculated in a culture medium containing NaClO, having as ASC source, and also the efficiency of the deionized / autoclaved water and distilled water in the preparation of the culture medium was tested, in order to verify the influence of both in the contamination of the culture medium. Therefore, contamination, germination and in vitro growth of the species were evaluated. The results showed that increasing doses of NaClO added to the culture medium had negative results for germination of *Hoffmannseggella caulescens* seedlings, with 10 mL.L⁻¹ of NaClO as the best dosage, with 100% germination. This dosage was also efficient in microbial control. The use of autoclaved water compared to distilled water was more efficient in microbial control. The results obtained showed the feasibility of dispensing the autoclave for the sterilization of culture media in the concentration of 10 mL.L⁻¹ of NaClO for the germination of *Hoffmannseggella caulescens*.

Key words: Tissue culture. Chemical sterilization. Seedling production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem de germinação de sementes de <i>Hoffmannseggella caulescens</i> em função do Hipoclorito de sódio e água destilada.....	17
Figura 2: Porcentagem de germinação de sementes de <i>Hoffmannseggella caulescens</i> em função do Hipoclorito de sódio e água autoclavada.	18
Figura 3: Porcentagem contaminação do meio de cultivo em função do Hipoclorito de sódio e água autoclavada.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 <i>HOFFMANNSEGGELLA CAULESCENS</i> (ASPARAGALES: ORCHIDACEAE) ..	9
2.2 O CULTIVO <i>IN VITRO</i> PARA ORCHIDACEAE	11
2.3 ESTERELIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* representa uma das plantas ornamentais mais procuradas no Brasil e no mundo. Por serem constituídas de flores perfeitas e exuberantes, a mesma possui grande diversificação, sendo aproximadamente 35.000 espécies, milhares de híbridos e 1.800 gêneros (PASQUAL, 2015).

Em condições naturais, a multiplicação de orquídeas ocorre através da proliferação de mudas laterais (brotações) ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas, porém, a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas interfere na eficácia da propagação em condições naturais, visto que tais sementes possuem pouca ou nenhuma reserva (REGO-OLIVEIRA & FARIA, 2005; SOARES *et al.*, 2010).

No Brasil, nos últimos dez anos, o comércio de orquídeas aumentou consideravelmente, principalmente devido ao aumento da importação, obtendo valores de US\$ 253 mil em 2004 para mais de US\$ 10,7 milhões em 2013, um acréscimo de mais de 4144% durante esse período (SUZUK, 2015). O faturamento do setor de plantas ornamentais em 2015 foi de R\$ 6 bilhões, contra R\$5,7 bilhões de 2014, a produção e a comercialização de flores e plantas ornamentais têm-se tornado um dos ramos mais dinâmicos da atividade agrícola de muitos países (IBRAFLOR, 2016).

A propagação natural das orquídeas é extremamente baixa e demorada. Apesar de seu fruto conter 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 (FONTES, 2011).

Avanços na biotecnologia possibilitaram o desenvolvimento de mudas de orquídeas com qualidade e em menos tempo. A raridade e a dificuldade de obter mudas e fazer a propagação de orquídea, por exemplo, eram os principais fatores do alto custo desta planta. Com a multiplicação e germinação *in vitro* este problema foi amenizado (EPAMIG, 2017).

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. Este método proporciona grande número de mudas, em espaço e tempo reduzidos, de maneira economicamente viável (REGO-OLIVEIRA & FARIA, 2005).

Várias propostas são postas em discussão, com a finalidade de promover menos dispêndio à técnica de germinação *in vitro*. Uma opção potencialmente promissora para a redução de custos, mas que não tem recebido a devida atenção é a perspectiva de substituir a

técnica de autoclavagem do meio de cultura por outra mais econômica (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Para Teixeira *et al.*, (2005) a produção em massa de algumas espécies em laboratórios comerciais apresenta custo elevado, como resultado do alto custo das instalações e da energia necessária. Ultimamente vem crescendo o interesse em se buscar novas opções para essa finalidade, e uma delas tem sido a substituição da técnica de esterilização por autoclavagem, por alguma outra de menor custo.

A técnica de autoclavagem, além de apresentar alto custo operacional, pode também danificar o meio de cultura. Em altas temperaturas ocorre a decomposição da sacarose com a formação de composto furfural, que é tóxico e impede o crescimento e desenvolvimento celular (RIBEIRO *et al* 2013).

Uma forma alternativa de tornar este processo mais acessível é, segundo o protocolo Teixeira *et al* (2008), utilizar no meio de cultura o Hipoclorito de Sódio (NaClO) como esterilizante químico, que visa evitar degradação de determinados componentes do meio de cultura, baixar os custos de manutenção e consumo da autoclave e reduzir o tempo para esterilização de meios nutritivos.

Neste contexto a proposta deste trabalho foi de analisar os efeitos de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na germinação *in vitro* da *Hoffmannseggella caulescens*, se o mesmo se torna benéfico ou não a germinação da planta e qual seria a melhor dosagem adicionada diretamente ao meio de cultura, além também de propor um novo método de esterilização para germinação *in vitro* desta espécie, ao testar o uso da água deionizada/autoclavada e água destilada no preparo do meio de cultura, com o objetivo de verificar qual a influência de ambas na contaminação do meio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *HOFFMANNSEGGELLA CAULESCENS* (ASPARAGALES: ORCHIDACEAE)

A família das *Orchidaceae*s possui grande importância na manutenção da biodiversidade, a mesma é composta por indivíduos avaliados como bioindicadores ambientais na conservação das florestas. Por serem compostas por nichos específicos, estas são compassivas às interferências decorrentes do meio e de sua complexa influência mútua e ecológica com polinizadores e microorganismos (PELÚZIO & SOARES, 2010; MARRARA *et al.*, 2011).

No Brasil, há 236 gêneros e 2.459 espécies de orquídeas, presentes em todos os biomas e formações vegetais, sendo que 1.628 espécies são endêmicas (BARROS *et al.* 2015). Estão presentes em quase todas as partes do mundo, do Ártico até os trópicos, ao nível do mar ou em grandes altitudes. Conforme seus hábitos de crescimento podem ser classificados em terrestres, rupícolas, e epífitas, sendo em sua grande maioria representadas pelas epífitas (FONTES, 2011).

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e apresentam grande potencial ornamental e econômico (IBRAFLO, 2017), devido, principalmente, à beleza e à diversidade de formas e cores de suas flores (REGO-OLIVEIRA & FARIA *et al.*, 2005). Muitas espécies de orquídeas estão ameaçadas de extinção e uma das causas se refere à forma como elas são propagadas (SCHNEIDERS *et al.*, 2014).

Além da sua importância ecológica e ornamental, as orquídeas possuem grande destaque no comércio interno e externo, gerando empregos e renda a vários produtores e mercadores, havendo um grande desenvolvimento do agronegócio (IBRAFLO, 2016).

Este estudo será atribuído à espécie *Hoffmannseggella caulescens*. A mesma possuem flores com coloração e formas muito variadas e são predominantemente polinizadas por abelhas (VEROLA, 2008). No entanto, esta espécie ocupa exclusivamente áreas de campos rupestres, apresentando características florais peculiares, tais como: a coloração do perianto (róseo, amarelo ou laranja, sem a presença de guias de néctar), morfologia floral (labelo em forma de goela e a presença de cunículo na região do ovário) e o posicionamento das flores (labelo curvado para baixo ou horizontalmente) que, de acordo com Pijl & Dodson (1966) indicariam tratar-se de um grupo adaptado à ornitofilia.

A mais recente lista oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, emitida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA),

enumera 472 espécies, dentre as quais 34 da família das Orquidáceas. Uma delas é a *Hoffmannseggella caulescens*, sendo uma espécie ornamental de ocorrência em Campos Rupestres quartzíticos e ferruginosos (Ministério do Meio Ambiente, 2014).

Segundo dados da CNC Flora (2013), a *Hoffmannseggella caulescens* encontra-se sujeita a cinco situações de ameaça, sendo uma delas a região do Quadrilátero Ferrífero. Devido a isso e também à coleta de plantas para fins ornamentais, essa espécie vem sofrendo declínio na área e qualidade do hábitat e no número de indivíduos maduros. Por isso, é considerada "Em perigo" (EN).

O Quadrilátero Ferrífero é uma região em Minas Gerais que é privilegiada com a maior variedade florística da América do Sul, contando com mais de 30% de endemismo em sua flora (GIULIETTI *et al.*, 1987 apud JACOBI *et al.*, 2008), dessa forma, esta é uma região prioritária quando se fala em conservação da biodiversidade no Estado de Minas Gerais, pelo fato de haver campos ferruginosos que são contemplados com espécies vegetais que só estão presentes naquela região, constituindo-se de um ambiente exclusivo em Minas Gerais (VINCENT, 2004). Entretanto, segundo Messias *et al.*, (2015) esta região encontra-se ameaçada devido à ação de mineradoras que exploram a hematita, ocorrente sob os itabiritos.

2.2 O CULTIVO *IN VITRO* PARA ORCHIDACEAE

O cultivo *in vitro*, enquanto técnica biotecnológica aplicada à produção vegetal tem permitido a obtenção de mudas de plantas que apresentam difícil multiplicação pelos métodos convencionais, originando plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em um período de tempo reduzido (CARVALHO & VIDAL, 2003). A mesma se trata é uma técnica que não apenas apresenta importância prática na área florestal e agrícola, mas, também na científica básica (PASQUAL, 2000).

A técnica de cultivo *in vitro* tem ganhando bastante espaço quando utilizado na multiplicação de orquídeas, devido ao fato que este grupo de plantas não possui endosperma desenvolvido (CARVALHO, 2012), necessitando que haja uma relação simbiótica com fungos micorrízicos, os quais fornecem os nutrientes necessários ao crescimento, porém, essa germinação natural não ocorre sempre com sucesso, dificultando sua propagação via seminal. Dessa forma a propagação *in vitro* é hoje a melhor forma de aumentar a produção de mudas e é responsável pela redução do custo de produção de diversas plantas, contribuindo decisivamente para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (STANCATO *et al.*, 2011), constituindo-se, portanto, técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico (MARTINI *et al.*, 2012).

De acordo com Martini *et al* (2001), a sementeira assimbiótica de orquídeas constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e ecológico. As plantas produzidas dessa forma podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à variabilidade genética gerada pelo explante.

Segundo Rodrigues *et al.*, (2013) a produção de mudas em laboratórios tem como vantagem o fato de produzir um maior número de mudas em um curto espaço de tempo, bem diferentes dos métodos tradicionais, a exemplo disto existem espécies que apresentam o primeiro florescimento de 5 à 7 anos, com a produção em laboratório este tempo de florescimento diminui de 3 à 4 anos, em seguida tem-se como vantagem a alta qualidade fitossanitária, sendo a mesma livre de doenças, com um maior potencial fisiológico, e consequentemente maior qualidade em seu crescimento e florescimento (SCHNEIDERS *et al* 2012).

Com o auxílio da cultura *in vitro* é possível que uma planta de interesses desejáveis possa ser multiplicada por vários subcultivos, ocorrendo à possibilidade de que uma nova cultivar esteja disponível mais rapidamente para uso comercial (PASQUAL, 2000), diminuindo assim, o extrativismo indiscriminado de espécies naturais. Entretanto essa técnica

de cultivo ainda é muito onerosa, necessitando de equipamentos caros e alto custo operacional (PEDROSO-DE-MORAES, 2000).

2.3 ESTERELIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA

Para pequenos produtores e colecionadores de orquídeas, os equipamentos utilizados na técnica de cultivo *in vitro* são poucos acessíveis, devido ao custo elevado, todavia, pesquisadores têm buscado meios para simplificar esta técnica de cultivo *in vitro* (TEIXEIRA *et al*, 2005).

Diante do exposto, para que se possam reduzir os custos do processo de micropropagação, uma importante etapa passível de ser modificada é a assepsia, fator fundamental na cultura de tecidos de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2017). No método convencional, utiliza-se da autoclavagem dos meios de cultivo, que se constitui numa operação dispendiosa que demanda alto consumo de energia elétrica. Uma alternativa mais econômica para eliminar os possíveis contaminantes durante o processo é a utilização do hipoclorito de sódio (NaClO), que é um produto químico com elevado potencial esterilizante de meios de cultura, como demonstrado por Teixeira *et al.* (2005), Teixeira *et al.* (2008) e Ribeiro *et al.*, (2011).

O hipoclorito de sódio tem propriedades germicidas, sendo muito usual em tratamentos da água, na desinfestação de legumes, na produção de desinfetantes industriais, sendo mais conhecido na forma de água sanitária comercial (ASC) (FONTES, 2011).

O emprego de NaClO, tendo como fonte ASC na esterilização de meios de cultura e desinfestação de sementes, mostra-se um método eficiente e de baixo custo como alternativa á autoclavagem (RODRIGUÊS, 2010), além de ser um produto de fácil aquisição (FONTES, 2011).

Os desinfetantes químicos mais utilizados são o etanol e os compostos à base de cloro, 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) e hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂) em meio de cultura contendo *Gerbera jamesonii* (CARDOSO & SILVA, 2012).

Vargas *et al* (2016), utilizaram dióxido de cloro (ClO₂) para esterilização química no cultivo *in vitro* de porta-enxerto de pessegueiro, podendo dessa forma constatar o efeito

positivo do esterilizante químico na sobrevivência dos explantes, diminuindo assim a contaminação por bactéria, fungos e oxidação.

Oliveira *et al* (2017) realizaram a esterilização química do meio de cultivo para a propagação vegetativa *in vitro* do abacaxizeiro ‘vitória’. Os mesmos relatam a eficiência obtida ao substituir a autoclavagem dos meios e vidrarias pela esterilização química com NaClO, sem prejuízo ao crescimento e ao aparato fotossintético das mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’.

Alvarez-Pardo *et al.* (2014), 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* foram mais tolerantes aos efeitos da desinfestação. O tratamento com 4,2 g.L⁻¹ de NaClO (143 mL de ASC), por 5 min, mostrou-se, para a maioria das espécies, mais eficaz no controle da contaminação, com 87 % de germinação das sementes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da contaminação do meio cultura e germinação *in vitro* de *Hoffmannseggella caulescens* sob diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio adicionado ao meio de cultura preparado com água autoclavada e água destilada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor dosagem de NaClO para o controle microbiano do meio de cultura.
- Determinar a melhor dosagem de NaClO para a germinação de sementes de *Hoffmannseggella caulescens*.
- Avaliar a eficiência da água autoclavada e água destilada no preparo do meio de cultura.
- Propor um protocolo viável e econômico para multiplicação de *Hoffmannseggella caulescens*.

4. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, situado na região Centro-Nordeste do Estado de Minas Gerais.

Para esse experimento foi utilizado sementes oriundas das cápsulas da *Hoffmannseggella caulescens*, doadas pela Biofábrica da Vale do Rio Doce, localizada no Centro de Tecnologia de Ferrosos, em Nova Lima, Minas Gerais. A biofabrica da Vale S/A realiza trabalhos quanto à reestruturação das espécies perdidas na região de Itabirito.

Antes do início do experimento, foi realizado a desinfestação das vidrarias utilizada para o preparo do meio de cultura, sendo as mesmas lavadas com detergente neutro, enxaguadas e deixadas por um período 10 minutos em solução com ASC. Logo após, foram novamente lavadas e enxaguadas com água destilada (FONTES, 2011).

O preparo do meio de cultura foi realizado 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, em seguida, o pH foi ajustado a 5,7 (EMBRAPA, 2008).

O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), meia força, 15 g.L⁻¹ de sacarose (Synth), 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol (Vetec), 7 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico (Alphatec) e 2 g.L⁻¹ de carvão ativado (Dinâmico), e os sais MS. O meio não foi autoclavado sendo que cada frasco recebeu as dosagens de ASC (O GLOBO) para avaliar o efeito esterilizante do mesmo. A incubação ocorreu em sala de crescimento, utilizando frascos de vidro contendo 40 mL de meio nutritivo.

Foram montados dois experimentos, um deles utilizando água autoclavada e o outro água destilada. Em ambos adotou-se o delineamento é inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições, nas quais foram testadas cinco concentrações de hipoclorito de sódio: T1 – 0,0 mL.L⁻¹ (Testemunha); T2 – 5,0 mL.L⁻¹; T3 – 10,0 mL.L⁻¹; T4 – 15,0 mL.L⁻¹ e T5 – 20,0 mL.L⁻¹, Cada repetição era composta por quatro frascos. Os ensaios tiveram os dados submetidos à análise de variância, e os dados submetidos à regressão linear.

As cápsulas fechadas foram lavadas externamente com detergente e água corrente e, no interior da câmara de fluxo laminar foram abertas no sentido de sua deiscência, de modo a dividir os três carpelos, utilizando-se pinça e bisturi. As sementes retiradas foram desinfestadas com álcool 70% durante cinco minutos e hipoclorito de sódio com 1% de cloro

ativo durante 30 minutos, seguido de três lavagens consecutivas em água destilada. Todo o processo de desinfestação foi de acordo com o protocolo laboratorial (EMBRAPA, 2008).

Para o semeio foi utilizada uma piceta, onde as sementes foram vertidas em uma solução desinfetante ($1/3$ de água sanitária e $2/3$ de água destilada) na quantidade de 30 mL, ficando em contato por um período de 10 minutos. Após o período citado, foram acrescentados 250 mL de água destilada e deionizada na piceta. Foi aspergido com auxílio da piceta o total de 10 gotas da solução de água e sementes no frasco com o meio de cultura, em seguida os frascos foram lacrados e identificados (FONTES, 2011).

As avaliações foram efetuadas por um período de 60 dias, sendo avaliado o efeito das diferentes dosagens de hipoclorito de sódio sobre a contaminação, oxidação do meio e germinação das sementes, que se procedeu com a contagem diária dos frascos que sofrem esse processo.

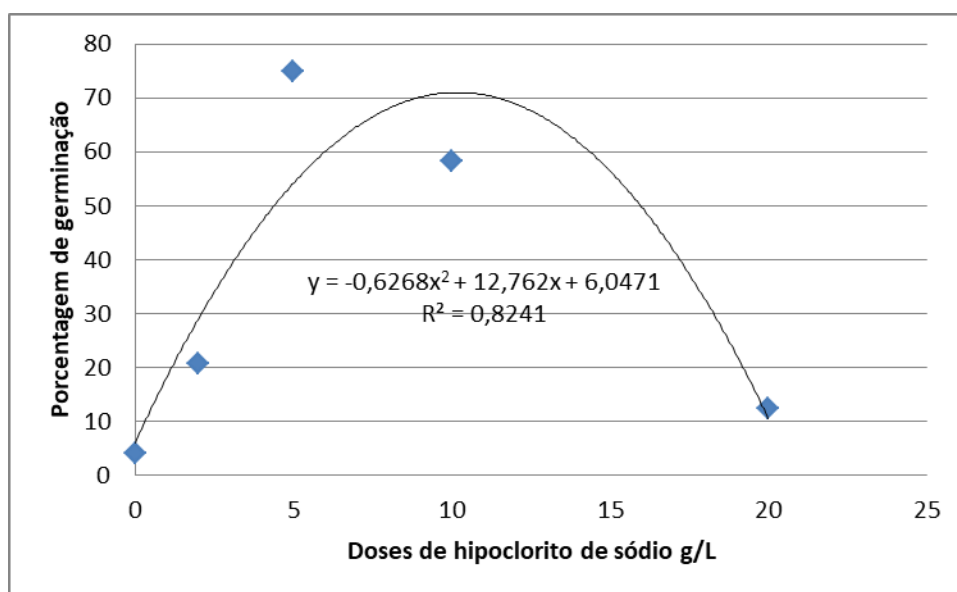
5. RESULTADO E DISCUSSÃO

A esterilização de meios de cultura com água sanitária comercial (ASC) mostrou-se eficiente no controle da contaminação, sendo que o mesmo influenciou diretamente na germinação de sementes de *Hoffmannseggella caulescens*.

Pode-se constatar que a germinação atingiu 70%, ao se utilizar água destilada para preparação do meio de cultivo na dosagem de 10 mL.L⁻¹ de hipoclorito de sódio (figura 1). Podendo também se verificar que, o aumento da dose de ASC adicionada ao meio de cultura apenas exerceu efeito tóxico sobre as sementes e protocórmios no meio de cultivo. Resultado também encontrado por Fontes (2011), ao realizar a esterilização química no cultivo de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe.

Segundo Ribeiro *et al* (2013), em relação às dosagens, sabe-se que altas concentrações de hipoclorito podem danificar as sementes ou interferir em relações de absorção, metabolismo dentre outros fatores morfogênicos.

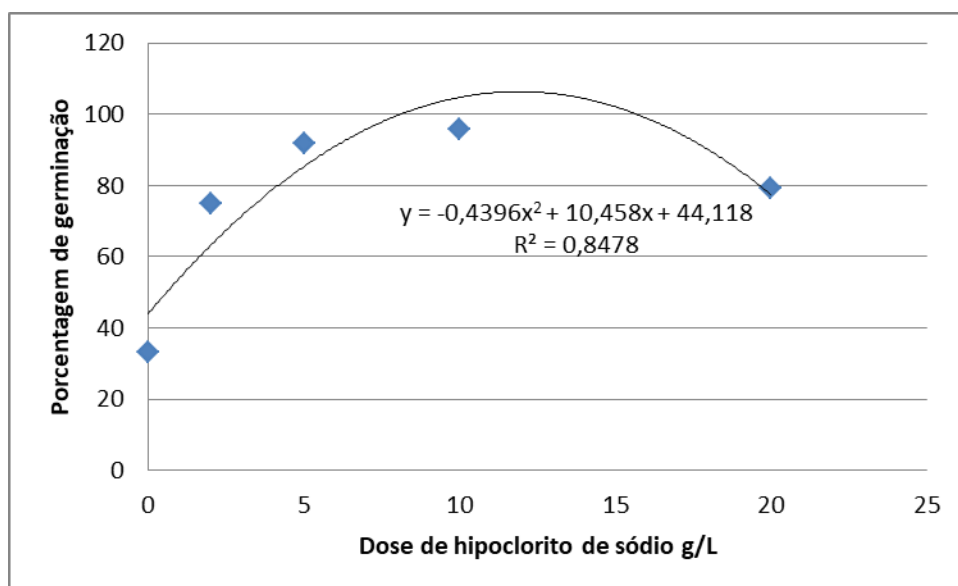
Figura 1: Porcentagem de germinação de sementes de *Hoffmannseggella caulescens* em função do hipoclorito de sódio e água destilada



Fonte: O autor

O uso de água autoclavada no preparo do meio de cultura se mostrou ainda mais eficiente para a germinação de plântulas de *Hoffmannseggella caulescens*, obtendo-se 100 % das sementes germinadas na concentração de 10 mL.L⁻¹ (figura 2). Segundo Teixeira (2008), este resultado é devido mesma possuir menor presença de íons e pelo fato da temperatura eliminar grande quantidade de microorganismos.

Figura 2: Porcentagem de germinação de sementes de *Hoffmannseggella caulescens* em função do hipoclorito de sódio e água autoclavada.



Fonte: O autor

Com um menor índice de contaminação obtém-se uma influência diretamente positiva na germinação. Contudo deve-se haver um cuidado quanto à assepsia dos materiais e vidrarias utilizados. A realização de uma assepsia criteriosa em trabalhos onde não se utiliza autoclave é de extrema importância para se obter um respaldo positivo nos resultados (OLIVEIRA *et al*, 2017).

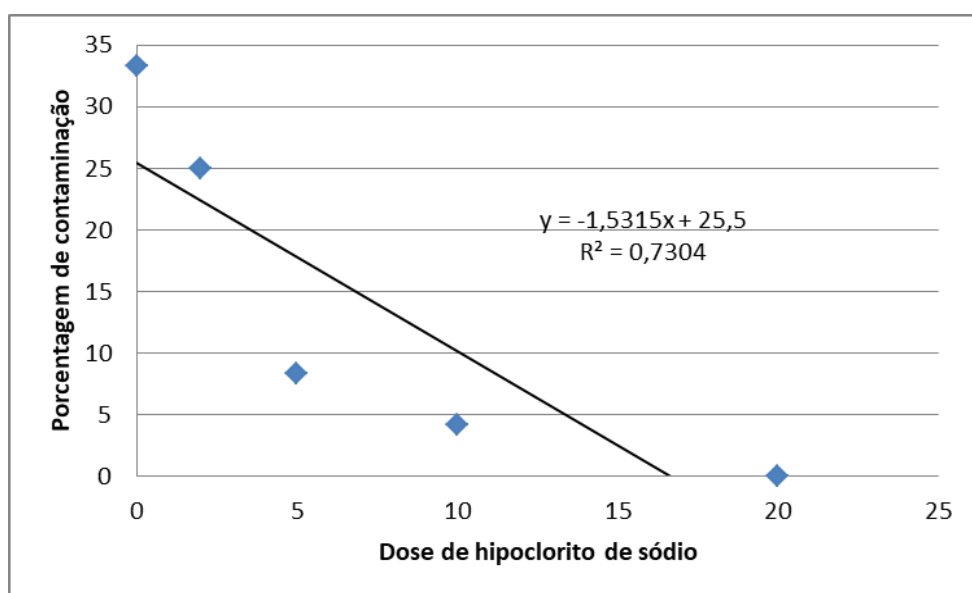
O sucesso da esterilização química com o NaClO deve-se não apenas à adição do produto ao meio de cultura, mas também ao procedimento de sanitização das vidrarias com NaClO previamente à distribuição do meio nos recipientes de cultivo (TEIXEIRA *et al*, 2006), já que Yanagawa *et al*. (1995) observaram problemas de contaminação dos meios com o uso do NaClO e ausência de sanitização da vidraria.

Em relação à contaminação, as maiores porcentagens de crescimento microbiano foram observadas quando não se utilizou o hipoclorito de sódio, sendo o tratamento controle. Neste sentido, ao utilizar água autoclavada e não adicionando o Hipoclorito de Sódio, a contaminação foi de 25% (Figura 3). Evidenciando a diminuição do crescimento microbiano ao utilizar água autoclavada.

Não foi possível ajustar um modelo que explique os dados de contaminação ao se utilizar água destilada, sendo observado que a dose de 5 ml/L é eficiente no controle microbiano.

Teixeira *et al.* (2008) obtiveram êxito na esterilização de meio de cultura líquido, com uso de hipoclorito de sódio como agente químico de esterilização. Em trabalho realizado com cultivo *in vitro* de *Eucalyptus pellita*, em meio esterilizado com NaClO, os autores não observaram problemas de desenvolvimento das plantas até a concentração de 0,007%, e obtiveram 100% de esterilização dos meios de cultura a 0,005% de NaClO (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Já 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⁻¹ASC), para o crescimento *in vitro* de *Sequoia sempervirens*.

Figura 3: Porcentagem contaminação do meio de cultivo em função do Hipoclorito de sódio e água autoclavada



Fonte: O autor

Estatisticamente as contaminações do meio de cultura foram menores na dosagem 16 mL/L, sendo este resultado demonstrado no uso de água autoclavada. Resultados semelhantes foram encontrados por Fontes (2011) ao realizar experimentos utilizando hipoclorito de sódio como esterilizante químico em sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe, podendo verificar que em menores quantidades o mesmo mostra-se eficiente no controle da atividade microbiana em meios de cultura. A dosagem de 2 mL/L proporcionou 46,98% de plântulas viáveis, enquanto que na maior dosagem de 40 mL/L houve apenas 17,97% de plântulas viáveis.

6. CONCLUSÃO

A esterilização química do meio de cultura utilizado para germinação de sementes de *Hoffmannseggella caulescens* mostrou-se significativa.

Doses a parti de 5 mL.L⁻¹ se mostram eficientes para o controle microbiano no meio de cultura.

Observou-se resultados satisfatórios ao suplementar o meio com 10 mL.L⁻¹ de NaClO, obtendo-se com isso 100 % germinação, no entanto doses crescentes de NaClO causaram efeito negativo a parti do ótimo na germinação de *Hoffmannseggella caulescens*.

O uso da água autoclavada para o controle microbiano mostrou-se mais eficiente que o uso da água destilada no preparo do meio cultura.

A adoção desse protocolo dispensa o emprego da autoclavagem como técnica de esterilização de meios de cultura para *Hoffmannseggella caulescens* na concentração de 10 mL.L⁻¹ de NaClO adicionado ao meio de cultura, devendo haver em conjunto técnicas de assepsia de materiais e vidrarias para que assim resultados satisfatórios sejam obtidos para adoção deste protocolo para a espécie em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G. & NUNES, V.F. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Hort. Bras.**, 24:217-220, 2006.
- BARROS, F. DE, VINHOS, F., RODRIGUES, V.T. ET AL. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB066932>>. Acesso em: 05 de setembro de 2018.
- CARDOSO, J.C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. **Pesq. Agropec. Bras.**, 44:785-788, 2009.
- CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO₂) to sterilize the culture medium. **In Vitro Cellular e Developmental Biology**, v.48, n.1, p.362–368.
- CARVALHO, A.C.P.P.; TOMBOLATO, A.F.C.; RODRIGUES, A.A.J. Panorama da Cultura de Tecidos no Brasil com Ênfase em flores e Plantas Ornamentais. In: JUNGHANS, T.G. (Ed.) **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2ª Edição revista e ampliada. Brasília. EMBRAPA, 2013. P. 13-54.
- CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Noções de cultivo de tecidos vegetais. **Documentos 116**. Embrapa Algodão. Campina Grande. 2003. 39p.
- CNC Flora. *Hoffmannseggella caulescens* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2013.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hoffmannseggella caulescens](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hoffmannseggella%20caulescens)>. Acesso em 05 de setembro de 2018.
- CURVETO, N.; MARINANGELI, P. & MOCKEL, G. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a tradicional methodology. **Biocell**, 30:497-500, 2006.
- 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.
- EMBRAPA. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus**. AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 61). Disponível em: < <http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 05 de Maio de 2018.
- EPAMIG. **Propagação de mudas torna acessível o mercado de orquídeas**. Disponível em: <<https://epamig.wordpress.com/2017/12/07/propagacao-de-mudas-torna-acessivel-comercio-de-orquidea/>>. Acesso em: 31 de agosto de 2018.

FONTES, A. A., **Desinfestação química para o semeio e recultivo in vitro de Orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, MG, 2011.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo**, v.9, p.1-151, 1987.

IBRAFLO. **Informativo**, Outubro de 2016 - Ano 07/ Volume 70.

JACOBI C. M.; CARMO F. F.; VINCENT, R. C. Estudo fitossociológico de uma comunidade vegetal sobre canga como subsídio para a reabilitação de áreas mineradas no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Revista Árvore**, v.32, n.2, p.345-353, 2008.

LOPES, F. S.; QUEIROZ, R. P.; SILVA, P. A. FOLLI, M. S.; RABELLO, W. S.; CRUZ, L. M. MINAS, R. S.; AMARAL, J. A. T.; SCHIMILDT, E. R., Interferência da descontaminação de sementes Orquídeas *Laelia tenebrosa* rolfe na germinação e desenvolvimento *in vitro*. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. **Anais...**, São Paulo, 2005.

MARRARA, M.; BRESCANSIN, R.B.; ZAMBOM, R.I.; GAGLIARDO, V.C.; MORAES, P. de; JÚNIOR, R.O. Florística da família Orchidaceae em fragmento florestal semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2011. **Anais...**, Caxambu - MG, 2007, p. 1- 2.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesq. agropec. bras.** vol.36 no.10 Brasília Oct. 2001

MESSIAS, M. C. T. B.; LEITE, M. G. P.; MEIRA-NETO, J. A. A.; KOZOVITS, A. R. Fitossociologia de Campos Rupestres Quartzíticos e Ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 230-242, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Instrução Normativa** n. 245, 18 de novembro de 2014. Lista nacional oficial das espécies da flora ameaçadas de extinção, Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 2014. Seção 1, p.110-118.

OLIVEIRA et al. Esterilização química e agentes geleificantes alternativos na propagação vegetativa *in vitro* do abacaxizeiro ‘vitória. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 4, p. 819-826, Dezembro 2017.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2015.80p.

PEDROSO-DE-MORAES, C. **Cultivo de orquídeas**. Araras: Biblioteca Duse Rüeffer Ometto, 2000. 130p.

PELÚZIO, L. E.; SOARES, M. N. Orquídeas: Porta aberta para a educação ambiental. **Revista Ponto de Vista**, v.1, n.1, p.55-63, 2010.

PIJL, L. van der & DODSON, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.

RAMOS, M S. S. As Orquídeas e sua reprodução pela semente. **Edição da Fazenda Anhumas**, Campinas, 1977.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, no. 1, p. 1-5, 2005.

RIBEIRO, J. M.; PINTO, M.S.; TEIXEIRA, S.L. **Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudanças In Vitro**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2013. (Embrapa Semiárido. Documentos, 256). Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 05 de setembro de 2018.

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**. Tese de Doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2010, 50p.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R. B.; SUZUKI, R. M., Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185-191, mar/abr, 2012.

SEBRAE. Flores e Plantas Ornamentais do Brasil – Volume 03. **Série de Estudos Mercadológicos**. 2016.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; CARVALHO, J. G. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n.2, v.32, p.626-629, 2010.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de semente *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de Caso. **Rev. Bras. Hortic. Orn.**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2011.

SUZUKI, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil do Instituto de Botânica de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto de Botânica, 21, 2014, São Paulo. **Resumos...** Instituto de Botânica de São Paulo, 2015.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T., Utilização de Hipoclorito de Sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 18, n. 2, p. 185-191, abr.-jun 2008.

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.

VARGAS, D. P.; FORMOSO, R. S.; DUTRA, L. F. Esterilização química para o cultivo *in vitro* de porta-enxerto de Pessegueiro. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n.1, Jan-Jun. 2016, p.01-06.

VEROLA C. F.; **Estudos Biossistemáticos em Espécies de *Hoffmannseggelia* H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae) Ocorrentes nos Complexos Rupestres de Altitude.** Tese de Doutorado (Ecologia). Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2008.

VINCENT, R. C. **Florística, fitossociologia e relações entre a vegetação e o solo em áreas de campos ferruginosos no quadrilátero ferrífero,** Minas Gerais. 2004. 144f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biociências, USP, 2004. 144p.

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.