

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

DAYANA ROTILI NUNES PICOLOTTO

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum*
HOEHNE.**

CHAPADÃO DO SUL – MS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

DAYANA ROTILI NUNES PICOLOTTO

**CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum*
HOEHNE.**

Orientador: Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia, área
de concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS
2013



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Câmpus de Chapadão do Sul



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: DAYANA ROTILI NUNES PICOLOTTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto

TÍTULO: CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* HOEHNE.

Prof. Dr. Presidente Vespasiano Borges de Paiva Neto

Prof. Dr. Sebastião Ferreira de Lima

Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto

Chapadão do Sul, 16 de dezembro de 2013.

A DEUS,
criador supremo,
por ter me dado a condição necessária para concluir este trabalho

Ao meu marido Ítalo Picolotto
e aos meus filhos Henryque e Steffany,
pela compreensão e carinho comigo

Aos meus pais,
Ademar Gessi Nunes e Elaine Maria Rotili Gessi,
pelo incentivo e apoio nas minhas decisões

Ao meu irmão,
Ademar Rotili Nunes Júnior,
pelo companheirismo e amizade

Ao meu Orientador,
Vespasiano Borges de Paiva Neto,
pela oportunidade e auxílio

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela disponibilidade da estrutura necessária para execução do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período da realização desse trabalho.

Ao meu orientador Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto pelos acolhimentos, por todas as vezes que me fez chorar, acreditando que cada lágrima seria um avanço pessoal, pelo incentivo nas horas difíceis, por ter acreditado na importância do trabalho, pela ajuda, paciência e amizade.

Às técnicas de laboratório Amanda Galdi Boaretto e Daly Roxana Castro Padilha pelo apoio técnico excepcional, pela ajuda e amizade.

Aos colegas de laboratório, Janaína, Ana Paula, Matheus, Jamile e Kattyane, por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem deste trabalho.

A minha família pela ajuda, compreensão e apoio em mim depositados em todos os momentos.

*“A MAIOR RECOMPENSA PARA O TRABALHO DO HOMEM NÃO É O QUE
ELE GANHA COM ISSO, MAS O QUE ELE SE TORNA COM ISSO.”*

John Ruskin

RESUMO

PICOLOTTO, Dayana Rotili Nunes. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cultivo *in vitro* e aclimatização de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. Professor Orientador: Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto.

A propagação *in vitro* de orquídeas é utilizada para conservação de espécies e produção de plantas comercialmente importantes, porém, há exigências específicas para atender às necessidades de cada vegetal. O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo para obtenção de mudas de *Cyrtopodium paludicolum* pelo uso de técnicas de propagação *in vitro*. Foram testadas técnicas de germinação *in vitro* para sementes de cápsulas maduras e imaturas, associadas com concentrações de ácido giberélico. Os tratamentos com as concentrações de 0,0; 4,0, 8,0 e 16,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) foram utilizados para germinação de sementes de cápsula imatura e 0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de AG₃ para sementes de cápsulas maduras. Para as sementes de cápsula imatura a germinação (61,06%) só ocorreu com 16,0 mg L⁻¹ AG₃; já para as sementes maduras a germinação ocorreu em todos os tratamentos, porém AG₃ não foi fator determinante para obtenção dos maiores percentuais aos 90 dias após a incubação das sementes; mostrando que, dependendo da maturidade fisiológica das sementes, efeitos estimulatórios e inibitórios podem ocorrer. Quanto ao crescimento e desenvolvimento vegetativo, foram testados tipos e concentrações de carboidratos no meio de cultura, sendo: sacarose, glicose, frutose e rafinose nas concentrações de 0, 10, 20 e 40 g L⁻¹, adicionados em meio Knudson. Foram utilizados protocormos e após 90 dias verificou-se que para a altura da parte aérea, na concentração de 10 g L⁻¹, a sacarose mostrou-se vantajosa, porém na concentração de 40,0 g L⁻¹ não houve diferença entre as fontes de carboidratos. Para comprimento da maior raiz, número de folhas e matéria fresca, a glicose e sacarose demonstraram-se mais eficientes nas concentrações de 25,0 a 32,0 g L⁻¹. Concluiu-se que os tipos de carboidratos influenciaram o crescimento *in vitro* de *C. paludicolum*, sendo recomendável sacarose ou glicose nas concentrações de 25 a 32 g L⁻¹. Na micropropagação da espécie, foram testados os fitorreguladores ácido 1-naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) em diferentes concentrações: ANA (0,00; 0,25 e 0,50 mg L⁻¹) e TDZ (0,00; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹), adicionados em meio Knudson. Os explantes foram ápices radiculares com aproximadamente 1,0 cm, oriundos de vitroplantas de *C. paludicolum*. Houve interação significativa entre os hormônios vegetais, obtendo-se bons resultados na concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de TDZ. Para a aclimatização, foram testados diferentes substratos (argila, terra vegetal, argila + terra vegetal, argila + adubo orgânico) na presença ou não de lâmina de água constante, resultando em oito tratamentos. Após 90 dias verificou-se que a lâmina de água demonstrou-se favorável em todas as variáveis exceto para o substrato argila. O substrato com argila + adubo orgânico resultou em melhor desenvolvimento vegetal além de proporcionar a maior média de sobrevivência das mudas de *C. paludicolum*.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, Fonte de carbono, Fitorreguladores.

ABSTRACT

PICOLOTTO, Dayana Rotili Nunes. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cultivo *in vitro* e aclimatização de *Cyrtopodium paludicum* Hoehne.

Author: Dayana Rotili Nunes Picolotto.

Adviser: Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto.

Propagation *in vitro* of orchids is used for conservation of species and to production of plants commercially important, however, there are specific requirements to meet the needs of each plant. The objective of this study was to determine a protocol for obtaining seedlings *Cyrtopodium paludicum* using techniques of *in vitro* propagation. Germination *in vitro* to mature and immature seeds techniques associated with gibberellic acid concentration were tested. Treatments with concentrations 0.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mg L⁻¹ of gibberellic acid (GA₃) were used for immature seeds germination and 0.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ GA₃ for mature seeds. To the immature seed germination only occurred (61.06%) with 16.0 mg L⁻¹ GA₃, whereas for mature seed germination occurred in all treatments, but GA₃ was not a determining factor for obtaining the highest percentage at 90 days after incubation of seeds, showing that depending on the physiological maturity of seeds that stimulatory and inhibitory effects may occur. For growth and vegetative development, types and carbohydrate concentrations were tested added to Knudson medium at 0, 10, 20 and 40 g L⁻¹ of sucrose, glucose, fructose, and raffinose. Protocorms were used as plant material and after 90 days it was found that for the shoot height, the concentration of 10 g L⁻¹ sucrose proved to be advantageous, but at a concentration of 40.0 g L⁻¹ there was no difference between carbohydrate sources. For the longest root length, number of leaves and fresh weight, glucose and sucrose proved to be more efficient than fructose and raffinose. So the type of carbohydrate affected the *in vitro* growth of *C. paludicum*, glucose or sucrose is recommended at concentrations of 25 to 32 g L⁻¹. In the micropropagation experiment, the plant hormones tested were 1-naphthalene acetic acid (NAA) and thidiazuron (TDZ) at different concentrations NAA (0.00, 0.25 and 0.50 mg L⁻¹) and TDZ (0.00, 0.50 and 1.00 mg L⁻¹), added Knudson medium. Explants from root tips measuring approximately 1.0 cm, derived from *in vitro* plants of *C. paludicum*. There was a significant interaction between hormones, were used as plant material in the concentration of 0.25 mg L⁻¹ NAA and 0.50 mg L⁻¹ TDZ. For acclimatization, different substrates were tested (clay, topsoil, topsoil + clay and clay + organic fertilizer) in the presence or absence of constant water slide, resulting in eight treatments. After 90 days it was noted that the water slide demonstrated favorable in all variables except for the clay substrate. The substrate with clay + organic fertilizer showed better plant development in addition to providing the highest mean seedling survival of *C. paludicum*.

KEY-WORDS: Orchidaceae, Carbon source, Plant growth regulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	PÁGINA
1 Área de coleta de material vegetal de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne para o desenvolvimento da pesquisa. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013	4
2. Inflorescência de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.....	5
CAPÍTULO 1 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	
1. Porcentagem de germinação de sementes oriundas de cápsulas maduras de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (AG ₃) e tempo de avaliação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013	26
2. Germinação de sementes oriundas de cápsula madura de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne. Barra = 1 cm. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	26
CAPÍTULO 2 – FONTE DE CARBONO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	
1. Altura da parte aérea (mm) de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em função das concentrações de sacarose (A), glicose (B), frutose (C) e rafinose (D). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	38
2. Resposta de número médio de raízes (A), comprimento médio de raízes – mm (B), número médio de folhas (C) e massa fresca – g (D), em função do aumento das concentrações de carboidratos em meio de cultivo, para plantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	40
3. Plantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne após a exposição a diferentes fontes e concentrações de carboidratos. Barra: 1 cm. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	42

CAPÍTULO 3 – INTERFERÊNCIA DE FITORREGULADORES NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

1. Formação de corpos semelhantes a protocormos (PLB) em ápices radiculares de vitroplantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne em meio de cultura Knudson sem a presença de regulador de crescimento. PLB formado a partir da ponta da raiz de mudas cultivadas de forma asséptica (A); PLB em desenvolvimento (B); PLB desenvolvendo raízes durante a conexão com a planta materna (C); vitroplanta desenvolvida a partir da raiz da planta mãe e PLB desenvolvendo-se no ápice radicular (D). Barras = 1 cm. Chapadão do Sul - MS, 2013.....	49
2. Micropropagação de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne a partir de ápices radiculares em meio de cultura Knudson na presença de 0,25 mg L ⁻¹ de ANA e 0,50 mg L ⁻¹ TDZ. Barras = 1 cm. Chapadão do Sul - MS, 2013.....	54

CAPÍTULO 4 – ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

1. Aclimatização de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne na presença de lâmina de água (A) ou na ausência (B). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.....	63
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
CAPÍTULO 1 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	
1. Porcentagem de germinação de sementes de cápsula imatura de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ₃) após 120 dias de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	23
2. Porcentagem de germinação de sementes de cápsulas maduras de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ₃) sob diferentes tempos de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	27
CAPÍTULO 2 – FONTE DE CARBONO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	
1. Altura da parte aérea (mm) de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne em função de diferentes fontes de carbono e concentrações destas no meio de cultivo, após 90 dias de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.....	36
2. Comprimento da maior raiz, número de folhas e matéria fresca de plantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> cultivadas em meio nutritivo contendo sacarose, glicose, frutose ou rafinose após 90 dias do início do experimento. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.....	39
CAPÍTULO 3 – INTERFERÊNCIA DE FITORREGULADORES NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	
1. Tabela 1. Quadrado médio (QM) do comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de brotações (NB.) e porcentagem de sobrevivência (%S) das vitroplantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne cultivadas em diferentes combinações de fitohormônios. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.....	52
2. Resposta de diferentes tratamentos de Thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotações (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e porcentagem de sobrevivência (%S), em função do aumento das concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) ao meio de cultivo, para micropropagação de plantas de <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.....	53

CAPÍTULO 4 – ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

1. Porcentagem de sobrevivência referente a diferentes substratos quando na ausência ou presença de lâmina de água na fase de aclimatização de plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013..... 64

2. Valores médios dos parâmetros de número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) referentes a plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne aclimatizadas em diferentes substratos – EH - (Presença de lâmina de água – PLA; Ausência de lâmina de água – ALA). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013..... 66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne	3
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de orquidáceas	5
2.2.1 Germinação <i>in vitro</i>	6
2.2.1.1 Reguladores de crescimento vegetal	7
2.2.2 Desenvolvimento vegetativo	8
2.2.2.1 Fontes de carbono	9
2.2.3 Micropropagação	9
2.2.4 Aclimatização	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO 1 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).....	18
RESUMO.....	18
CHAPTER 1 – EFFECT OF GIBBERELIC ACID ON SEED GERMINATION OF <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).....	18
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Local do experimento	21
2.2 Material Vegetal	21
2.3 Germinação de sementes de cápsula imatura.....	21
2.4 Germinação de sementes de cápsula madura.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1 Germinação de sementes de cápsula imatura	23
3.2 Germinação de sementes de cápsula madura.....	25
4. CONCLUSÕES	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2 – FONTE DE CARBONO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cyrtopodium paludicolum</i> (HOEHNE).	32
RESUMO	32

CHAPTER 2 - CARBON SOURCE ON <i>IN VITRO</i> CULTURE OF <i>Cyrtopodium paludicum</i> (HOEHNE)	32
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Local do experimento	34
2.2 Material vegetal	35
2.3 Fontes de carbono e concentrações de carboidratos	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÕES	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO 3 – INTERFERÊNCIA DE FITORREGULADORES NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Cyrtopodium paludicum</i> (HOEHNE).....	46
RESUMO	46
CHAPTER 3 - INTERFERENCE TO PHYTOREGULATORS IN MICROPROPAGATION OF <i>Cyrtopodium paludicum</i> (HOEHNE).....	47
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Local do experimento	50
2.2 Material vegetal	50
2.3 Tipos e concentrações de fitohormônios	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4. CONCLUSÕES	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO 4 – ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Cyrtopodium paludicum</i> (HOEHNE).	58
RESUMO	58
CHAPTER 4 – ACCLIMATIZATION OF <i>Cyrtopodium paludicum</i> (HOEHNE).....	58
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Local do experimento	61

2.2 Material Vegetal	61
2.3 Condições de aclimatização	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é composta por cerca de 25 mil espécies (DRESSLER, 2005), distribuídas em 850 gêneros (PRIDGEON et al., 1999; CHASE et al., 2003), com distribuição cosmopolita, não possuindo representantes apenas nas regiões polares, apresentando maior quantidade e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, existem mais de 2.400 espécies (BARROS et al., 2013), as quais são valorizadas por suas belas e duradouras flores e pela ampla diversidade em tamanho, fragrância e coloração (ROBERTS e DIXON, 2008). Dentre todas as espécies, vale ressaltar a *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, nativa do Cerrado Sul Mato-grossense, a qual sofre redução devido à coleta extrativista e a intensa expansão agrícola, é uma espécie facilmente identificada pelos pseudobulbos de tamanho mediano e inflorescência geralmente simples e alta com flores grandes, principalmente amarelas (BARROS et al., 2013).

Algumas espécies de orquídeas são utilizadas no setor alimentício e cosmético, como a baunilha (*Vanilla planifolia* Andrews), enquanto que outras como as do gênero *Dendrobium* são utilizadas como fontes medicinais, porém a utilização da grande maioria está relacionada à coleção ou decoração (HOEHNE, 1949; FARIA, 2004). Assim sendo, o cultivo e o comércio de orquídeas nativas adquiriram como prática o extrativismo, que aliado à destruição e exploração de seus habitats naturais, levou à extinção ou à ameaça de muitas espécies (SILVEIRA e STEFANELLO, 2013).

Em agosto de 2004, o New York Times relatou que “o mundo investiu 2 bilhões de dólares no mercado de orquídeas”, reforçando a ideia de ser uma das plantas ornamentais mais apreciadas (CHEN e CHEN, 2004). Além do valor comercial e aspecto ornamental, as plantas dessa família botânica possuem importante papel como componente florístico de diversos ecossistemas (SORGATO, 2013). No entanto, o desenvolvimento vegetativo das orquídeas é lento, visto que a divisão da muda demanda, no mínimo dois anos, o que torna muito onerosa a multiplicação de grandes quantidades de mudas para comercialização. A multiplicação das orquídeas por meio de sementes também é demorada e apenas 5% das 2,5 milhões de sementes encontradas por cápsula germinam (STANCATO et al, 2001). Vale ressaltar

que a multiplicação por meio de sementes apresenta maior dificuldade quando relacionada ao intuito de comercialização devido à variabilidade genética que as mudas poderão apresentar, assim, a cultura de tecidos apresenta vantagem quando referida a propagação massal.

A propagação *in vitro* tem sido utilizada há pouco mais de três décadas no Brasil, a fim de aumentar a produção de mudas e reduzir o custo, contribuindo direta ou indiretamente para salvar muitas espécies de orquídeas de extinção, assim, a cultura assimbiótica constitui uma relevante técnica do ponto de vista ecológico e comercial (MARTINI et al., 2001; STANCATO et al., 2001). Para tal, objetivou-se neste trabalho determinar um protocolo para obtenção de mudas de *C. paludicolum* pelo uso de técnicas de propagação *in vitro* e aclimatização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família Orchidaceae é originária da Malásia (GARAY, 1972) e possui uma distribuição cosmopolita, não sendo encontrada apenas em regiões polares onde há frio intenso e rigoroso. Possui aproximadamente 25.000 espécies, distribuídas em 850 gêneros sendo considerada a mais evoluída e maior do reino vegetal (PRIDGEON et al., 1999; CHASE et al., 2003; DRESSLER, 2005). No Brasil, existem mais de 2.400 espécies (BARROS et al., 2013), constituindo uma família botânica caracterizada por suas belas e duradouras flores e pela ampla diversidade em tamanho, fragrância e coloração (RAPOSO, 1993; ROBERTS e DIXON, 2008).

A polinização das orquídeas é realizada em geral por abelhas, mariposas, vespas, borboletas, moscas, morcegos e alguns beija-flores (INGROUILLE, 1995).

São espécies denominadas perenes e habitam diferentes meios podendo ser terrestres, saprófitas quando desprovidas de clorofila, rupestres ou epífitas, são rizomatosas ou caulescentes, com crescimento simpodial ou monopodial (SOUZA e LORENZI, 2005).

A maioria das orquídeas ostenta alto valor comercial devido a sua beleza, sendo considerado o mais antigo grupo cultivado entre as ornamentais, no entanto, cerca de 40 espécies estão ameaçadas de extinção (BRASIL,

2009), principalmente devido à diminuição de seu habitat natural, além da coleta e comercialização indiscriminada (SILVEIRA e STEFANELLO, 2013), no entanto, também sofrem devido ao processo natural de extinção assim como os demais vegetais.

O cultivo e comércio de orquídeas no Brasil e no mundo têm sido alicerçados em práticas de extrativismo predatório, juntos ao aumento das fronteiras agrícolas e também ao contínuo processo de urbanização, propiciando para diversas espécies, iminente perigo de extinção (GALDIANO et al., 2013). Assim sendo, a Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES incluiu todos os gêneros de orquídeas (ROBERTS e DIXON, 2008), sendo que no Brasil, a exportação dessas plantas é regulamentada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

Nos últimos anos, o setor de produção de flores aumentou no Brasil e atingiu uma importância significativa no mercado internacional, sendo a produção *in vitro* de flores essencial para produzir plantas com maior qualidade e maior valor comercial (MATA-ROSAS et al., 2011).

2.1 *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne

Cyrtopodium R.Br. é um gênero nativo do Brasil, o qual apresenta cerca de 39 espécies que possuem hábito terrestre, epífita ou rupícola, tendo o Cerrado como o bioma com maior diversidade das mesmas, no qual já foram identificadas aproximadamente 32 espécies (BARROS et al., 2013), sendo 4 delas encontradas no estado de Mato Grosso do Sul.

Cyrtopodium paludicolum Hoehne é uma orquídea geralmente encontrada em solos permanentemente úmidos (Figura 1) do Centro-Oeste e Sudeste brasileiro, em áreas do Distrito Federal e nos estados do Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (BARROS et al., 2013).

Segundo Mendonça et al. (1998), a espécie *C. paludicolum* é classificada como uma erva terrestre típica de áreas brejosas, possui pseudobulbos alongados de 10 a 40 cm de altura, inflorescência simples ou pouco ramificada atingindo até 2 metros de altura (Figura 2). De acordo com

Menezes (2000) suas flores estão entre as maiores do gênero com 3,5 a 3,8 cm de diâmetro, florescendo no período entre dezembro e abril.

Figura 1. Área de coleta de material vegetal de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne para o desenvolvimento da pesquisa. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.



Fonte: Dayana Rotili Nunes Picolotto.

As regiões com maior abundância de água e vegetação são ambientes propícios para o desenvolvimento da espécie, porém, estão sendo degradadas devido à exploração de argila e turfa, atividade agropecuária, avanço da urbanização, construção de estradas e canais de drenagem. Logo, as consequências têm sido desastrosas para este ambiente, resultando em assoreamentos, ressecamento dos solos, diminuição do volume hídrico, erosão e perda irreparável de sua beleza e biodiversidade, ameaçando de extinção às plantas de *C. paludicolum* (ARAÚJO et al., 2002). No município de Chapadão do Sul, esta espécie foi encontrada em quatro locais distintos e em pelo menos três destes locais, há intensa visitação humana, resultando na antropização do ambiente, associada a intensa coleta de espécimes.

Figura 2. Inflorescência de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.



Fonte: Vespasiano Borges de Paiva Neto.

2.2 Cultivo *in vitro* de orquídeas

A propagação *in vitro* tem sido utilizada há pouco mais de 30 anos no Brasil, a fim de aumentar a produção de mudas e em especial, reduzir o custo, de forma a contribuir para a reintrodução de muitas espécies de orquídeas em seus habitats naturais, reduzindo os riscos de extinção (STANCATO et al., 2001). Assim, a cultura assimbiótica ou sementeira *in vitro* de orquídeas constitui uma relevante técnica do ponto de vista ecológico e comercial, sendo as plantas produzidas desta forma, de grande importância para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação natural (MARTINI et al., 2001).

A produção em larga escala de espécies raras e híbridos, utilizando técnicas de cultivo assimbiótico de plantas tem auxiliado para que as orquídeas estejam entre as dez principais flores de corte no mundo (CHUGH et al., 2009). Estas técnicas de cultivo são capazes de propiciar a germinação, e ainda possibilitam o crescimento e o desenvolvimento de muitas espécies de orquídeas cultivadas (SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2013).

O suprimento de macro e micronutrientes no meio de cultura é parte essencial no sistema de cultivo *in vitro*. Atualmente, os meios utilizados são baseados nas modificações empíricas de algumas formulações básicas e nas exigências nutricionais de plantas inteiras (KANASHIRO, 2007). Desta forma,

vários compostos são adicionados aos meios de cultivo para suprir as necessidades energéticas, metabólicas e estruturais da célula, uma vez que as mesmas vias bioquímicas básicas que atuam nas plantas permanecem nos tecidos cultivados *in vitro* (STANCATO et al., 2008). Entretanto, as proporções consideradas ideais variam extensamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultura (WILLIAMS, 1993).

2.2.1 Germinação *in vitro*

A maioria das sementes da família Orchidaceae apresenta-se totalmente desprovidas de endosperma, por conseguinte, são dependentes da associação com fungos micorrízicos para obter as moléculas de carbono e os minerais necessários à germinação e ao desenvolvimento do embrião (RAMOS, 1969; ARDITTI, 1979; PIERIK, 1990). Contudo, a germinação atinge níveis elevados quando obtida por meio da cultura assimbiótica, se comparada com as condições naturais. Assim, a germinação *in vitro* é uma ferramenta, do ponto de vista biotecnológico, importante para a obtenção de um número significativo de mudas uniformes, além de propiciar plantas livres de doenças e pragas (SOARES et al., 2012).

Vários meios de cultura têm sido desenvolvidos para a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, isto é, sem a presença de fungos (RASMUSSEN, 1995; MARTINI et al., 2001). A utilização de diferentes formulações de meios, com a adição de sais minerais, vitaminas, hormônios ou compostos orgânicos é destinada a melhorar a germinação e o desenvolvimento *in vitro* destas plântulas (MARTINI et al., 2001; CAMPOS, 2004; RODRIGUES et al., 2012).

Para atender às necessidades de cada espécie, têm sido estudadas mudanças nos meios de cultura para orquídeas. Para tal, Schneiders et al. (2012) verificaram que a adição de 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) favorece a germinação de *Cattleya forbesii* e de *Cattleya harrisoniana*. Já, Sathiyadash et al. (2013) observaram maior percentual de germinação (85%) em sementes de *Acampae praemorsa* em meio MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de Benzylaminopurine (BAP). Zeng et al. (2012) obtiveram 65,33% de germinação de sementes de *Paphiopedilum wardii* com meio MS meia-força (1/2 MS macro e micro-nutrientes), contendo 0,5 mg

L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 10% de água de coco e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado (AC). Por fim, Faria et al. (2002) observaram que os constituintes do meio de cultura são essenciais para o desenvolvimento do embrião, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com as necessidades de cada espécie.

2.2.1.1 Reguladores de crescimento vegetal

Para o desenvolvimento de protocolos de multiplicação *in vitro* de orquídeas, o conhecimento das funções dos reguladores de crescimento é de extrema importância para sua devida utilização, assim, sua concentração pode promover, inibir ou modificar processos fisiológicos (KYTE e KLEYN, 2010).

As giberelinas são hormônios vegetais bioquimicamente caracterizados como ácidos diterpenóides tetracíclicos (CID, 2000), podem estimular a germinação de sementes não dormentes, além de favorecer a quebra da dormência das mesmas, promove a germinação, dentre outros efeitos fisiológicos, atuando como mediador entre fatores ambientais e internos restritivos da germinação; pode induzir genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios da semente ou ter efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião (KERBAUY, 2008).

Há um grande número de giberelinas que promovem a germinação de sementes, mas a forma mais utilizada é o ácido giberélico - AG₃ (COPELAND e MCDONALD, 1995). No entanto, há outros reguladores vegetais relacionados ao processo da germinação, como as citocininas, que possuem a capacidade de promover a germinação em determinadas espécies, porém os efeitos destas nesse processo ainda são pouco conhecidos (KERBAUY, 2008) e, em orquídeas, informações sobre a germinação com uso das citocininas são escassas.

Portanto, é necessária cautela na concentração e na composição de reguladores vegetais no meio de cultura, pois estes podem ser elementos determinantes para germinação e desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos, assim como os meios nutritivos que se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas

modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

2.2.2 Desenvolvimento vegetativo

A composição do meio de cultura é importante para a germinação das sementes e para o crescimento das plantas, sendo geralmente constituída de vitaminas, macro e micronutrientes, aminoácidos, sacarose e agente gelificante (GAMBORG, 1984; KNUDSON, 1946; MURASHIGE e SKOOG, 1962; VACIN e WENT, 1949; WHITE, 1951). Os macronutrientes (N, P, K, S, Ca e Mg) são essenciais para a nutrição e crescimento da plântula, afim de suprir todas as suas necessidades (MELO, 1999), entretanto, a maioria dos meios nutritivos é complexa, e podem conter reguladores de crescimento (VENTURA et al., 2007), os quais podem elevar os custos da propagação.

Reddy et al. (1992) avaliando diferentes meios de cultura para o desenvolvimento de *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium crispdatum* e *Epidendrum radicans*, constataram que o meio MS é uma alternativa eficiente no desenvolvimento vegetativo das três espécies analisadas. Já para plântulas de *Miltonia flavescens*, o maior crescimento *in vitro* foi apresentado em meio de cultura MS/2 suplementado com Phytigel® e em pH 5,8 (CHAPLA et al., 2006); no entanto, para *Dendrobium nobile*, o meio nutritivo simplificado formulado com adubo comercial Peters® (3 g L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹), banana (60 g L⁻¹) e ágar (4 g L⁻¹) mostrou-se eficiente para o crescimento e enraizamento (SONG et al., 1999). Herrmann et al. (2011) observaram que para plântulas de *Brassavola tuberculata*, o meio alternativo proposto por Campos (2002) proporcionou melhor desenvolvimento. De acordo com Debergh (1991) e Kozai (1991), a fonte de carbono também é um fator importante no meio de cultura, sendo as plântulas cultivadas *in vitro* consideradas heterotróficas.

Vários são os relatos de modificações no meio de cultivo para o desenvolvimento de mudas *in vitro*, assim como o de Faria et al. (2004), os quais verificaram que a adição de 60 g L⁻¹ de sacarose proporcionou maior crescimento e taxa de multiplicação de mudas de *Dendrobium nobile*. Pasqual et al. (2011) verificaram que a adição de silício em meio MS propiciou ausência de deformações foliares em plântulas de orquídeas. Pasqual et al. (2009) constataram a viabilidade de multiplicação de mudas *in vitro* de *Cattleya*

lodigesii com a utilização de meio Knudson (KNUDSON, 1946) líquido enriquecido com polpa de banana nanica.

2.2.2.1 Fontes de carbono

As plantas em cultivo assimbiótico, praticamente passam a atuar como heterotróficas e, portanto, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos para manter as condições favoráveis na realização da fotossíntese (KOZAI et al., 1991). Para tal, fontes de carbonos são adicionadas ao meio de cultura a fim de proporcionar energia metabólica e esqueletos carbônicos para a síntese de compostos orgânicos, como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998).

A sacarose é o carboidrato mais empregado em meios nutritivos, destinando-se a propagação de plantas ornamentais (FRAGUAS et al., 2003). No cultivo *in vitro* de orquídeas, porém, há fontes alternativas que também têm sido utilizadas com menor frequência como a frutose, glicose, maltose, entre outras (TOMBOLATO e COSTA, 1998; REGO-OLIVEIRA et al., 2003, BESSON et al., 2010). O suprimento exógeno de açúcar também é importante devido ao fato de poder ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas (HAZARIKA, 2003). Segundo Nicoloso et al. (2003), a fonte de carbono e concentração favoráveis dependem especialmente da espécie vegetal e da fase do desenvolvimento em que a planta se encontra.

2.2.3 Micropropagação

A micropropagação, multiplicação *in vitro* ou multiplicação em meio de cultura, se baseia no princípio da chamada “totipotência”, que é a capacidade de uma célula vegetal em se diferenciar, multiplicar e gerar uma nova planta. No entanto, a porcentagem de regeneração de plantas a partir de ápices caulinares é baixa para algumas espécies vegetais, devido a vários fatores, destacando-se a concentração ou combinação de reguladores de crescimento e composição do meio nutritivo (PIERIK, 1990; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1997). Outros fatores como intensidade de luminosidade e temperatura também podem interferir na regeneração de plantas.

Diversos são os reguladores de crescimentos utilizados em técnicas de micropropagação de orquídeas, assim como as diferentes concentrações, que podem variar de acordo com alguns fatores como o explante e a espécie vegetal. As citocininas, assim como as auxinas, são empregadas em técnicas de micropropagação, demonstrando bons resultados na indução para diferenciação em brotações (HU e WANG,1983; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1997; SMITH e MURASHIGE, 1970). Entre as auxinas, o ácido 1-naftaleno acético (ANA) é o mais recomendado na micropropagação de ápices radiculares (CHUGH et al., 2009) e, dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA₃) além de favorecer o alongamento da parte aérea, é capaz de reduzir a porcentagem de explantes necrosados (VALLES e BOXUS, 1987). Além do meio empregado e das condições de desenvolvimento e crescimento, os resultados do cultivo *in vitro* de ápices caulinares sofrem influência do genótipo. Assim, resultados diferentes são observados tanto no cultivo de diferentes espécies, como no de diferentes variedades de uma mesma espécie (CASTRO e ANDRADE, 1995).

2.2.4 Aclimatização

No cultivo de plantas ornamentais, incluindo as orquídeas, o processo de aclimatização é a última fase na obtenção de mudas e representa uma fase delicada, não só em função do estresse hídrico, fotossíntese e absorção de nutrientes pela plântula, mas também pelo perigo de infecções por fungos e bactérias, que podem se desenvolver neste estágio (TOMBOLATO e COSTA, 1998).

Diferentemente da condição em habitat natural, quando as orquídeas são cultivadas *in vitro*, é colocado no frasco todos os nutrientes necessários para o bom crescimento das mudas, no entanto, após determinado estágio estas mudas passam pelo processo de aclimatização, que consiste em retirar as plantas da condição *in vitro* e transferi-las para a condição *ex vitro* (casa de vegetação), controlando os atores que possam limitar o seu desenvolvimento, como temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; COSTA, 1998). Entretanto, as vitroplantas comumente apresentam características morfofisiológicas diferentes quando comparadas àquelas que cresceram diretamente no campo ou em

casa de vegetação, fator este que pode ser o responsável pela baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* (PREECE e SUTTER, 1991).

Assim, durante a fase de aclimatização das orquídeas, torna-se necessária a utilização de substratos e condições hídricas que permitam o estabelecimento vegetativo dessas plantas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G. M.; BARBOSA, A. A. A.; ARANTES, A. A.; AMARAL A. F. Composição Florística de Veredas no Município de Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.4, p.475-493, 2002.

ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research**. Academic Press, California, v.7, p.421-655, 1979.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. 2013. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11443>. Acesso em 20 de ago. 2013.

BESSION, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, p.9-13, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. **Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, v.145, n.185, p75-83, 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.87-132.

CAMPOS, D. M. de. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 2002. 143p.

CAMPOS, D. M. Cultura *in vitro* simplificada. **O mundo das orquídeas**, São Paulo, n.36, p.52-53, 2004.

CASTRO, A. O. A.; ANDRADE, A. G. Cultura *in vitro* de meristemas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.917-922, 1995.

CHAPLA, P. I.; BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M. da; ROCHA, A. C. de S.; STEFANELLO, S. Ph, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.61-67, 2006.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; BARRETT, R.S.; FREUDENSTEIN J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K. W.; KELL, S. P., BARRETT, R. L.; CRIBB, P. J., Ed(s). **Orchid Conservation Natural History Publications**. Kota Kinabalu, Sabah, 2003. p.69-89.

CHEN, H. H.; CHEN, W. H. **Orchids Biotechnology**. World Scientific Publishing, Taiwan. 2004. 258p.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Seed science and technology**. Chapman e Hall, New Jersey, USA, 1995. 409p.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Ed.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

DEBERG, P. C. Control of *in vitro* plant propagation. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M. (Ed.) **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC, FEALQ, 1991. p.3-8.

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v.26, n.1-2, p.155-158, 2005.

FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.2, n.3, p.489-492, 2002.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, V. R. O.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.780-783, 2004.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.50, n.719-726, 2003.

GALDIANO, R. F. Jr.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. de; LEMOS, E. G. de M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.1, p.583-591, 2013.

GAMBORG, O. Plant cell cultures: nutrition and media. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, New York, Academic Press, v. 1, 1984. p.18-26.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae. **Journal of the Arnold Arboretum**, v.53 n.11, p.202-215. 1972.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa, 1990. p.99-170.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: **Curso Sistemas de micropropagação de plantas**. Brasília, 1997. **Anais** Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1997. p.71-115.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, India, v.85, p.1704-1712, 2003.

HERRMANN, M. H.; FREITAS, E. M. de; PÉRICO, E. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166, 2011.

HOEHNE, F. C. **Iconografia das Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1949.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. p.117-227.

INGROUILLE, M. **Diversities and evolution of land plants**. 3 ed. London: Chapman e Hall, 1995. 340p.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. de C. S.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. dos S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, vol.34, n.1, p.59-66, 2007.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2008. 431p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.14, p.214-217, 1946.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro**, Santiago, Chile, v.27, p.47-51, 1991.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes: an introduction to micropropagation**. 3 ed. Portland, Oregon: Timber Press, 2010, 240p.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1319-1324. 2001.

MATA-ROSAS, M.; BALTAZAR-GARCIA, R. J.; CHAVEZ-AVILA, V. M. *In vitro* regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave e Lex. (Orchidaceae), endemic and threatened mexican species. **HortScience**, v.46, n.8, p.1132-1135, 2011.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITA, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.102-107. 1999.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. ET AL. Flora vascular do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (EDs.) **Cerrado : Ambiente e Flora. Planaltina**. Distrito Federal: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. p.289-556,

MENEZES, L. C. **Genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras**. Brasília, Ed. IBAMA, 2000. 208p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v.15, p.473-479, 1962.

NICOLOSO, F. T., ERIG, A. C., RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. A. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.84-90, 2003.

PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M. A.; REZENDE, J. C.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, p.211-216, 2009.

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

PIERIK, R. L. M. **Cultivo “in vitro” de las plantas superiores**. Madrid, Mundi Prensa, 1990. 301p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.).

Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum**. New York, Oxford University Press, v.1, p.197, 1999.

RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução por semente**. São Paulo: Ed. Saraiva, 1969. 163p.

RAPOSO, J. G. C. M. F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Ave Maria Ltda, 1993. 170p.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 460p.

REDDY, P. V.; NANJAN, K.; SHANMUGAVELU, K. G. *In vitro* studies in tropical orchids: seed germination and seedling growth. **Journal of Orchid Society of India**, Coimbatore, Índia, v.6, n.1-2, p.75-78; 1992.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SACONATO, C.H. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina**, Londrina, v.24, p.265-272, 2003.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, London, v.18, n.8, p.325-329, 2008.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; DIAS, J. M. M.; VILLANI, E. M. A. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, v.59, n.1, p1-8, 2012.

SANTOS, A. F.; VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; GOULART, M. S.; NOVAIS, R. F.; CECON, P. R.; TEIXEIRA, S. L.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, n.1, p.8-12. 2006.

SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.; MURUGAN, S. B.; SATHISHKUMAR, R.; UMA, E.; JAISON, S.; PRIYADHARSINI, P. *In vitro* asymbiotic seed germination, mycorrhization and seedling development of *Acampae praemorsa* (Roxb.) Blatt. & Mc Cann, a common south Indian orchid. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, Tamil Nadu - India, v.2, n.2, p.114-118, 2013.

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

SILVEIRA, E. V.; STEFANELLO, S. Crescimento e floração de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. (orchidaceae) tratadas com ácido giberélico. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.6, n.2, p.349-358, 2013.

SMITH, R.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolate shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, v.57, p.562-569, 1970.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.617-623, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, vol.31, n.1, p.63-67. 2013.

SONG, M. K. R.; SILVA, G. L.; FARIA, R. T.; TAKAHASHI, L. S. A. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 12 ed, Jaboticabal, 1999, **Anais**. Jaboticabal – CBFPO, 1999. p.110.

SORGATO, J. C. **Aclimatização de *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree**. 26/02/2013. 35p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, 2005. 768p.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.17, n.1, p.25-33, 2001.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Instituto Agrônômico de Campinas, v.67, p.51-57, 2008.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico (Boletim técnico, 174). 1998. 72p.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Cambridge, v. 110, p. 605-613, 1949.

VALLES, M.; BOXUS, P. Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. **Acta Horticulturae**, v.10, p.337-344, 1987.

VENTURA, G. M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo Cattleya, em diferentes meios de cultura e irradiâncias.** 05/07/2007. 147p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

WHITE, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, Cambridge, v.2, p.231-244, 1951.

WILLIAMS, R. R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. **Acta Horticulture**, Bruxelas, v.289, p.165-169, 1993.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., na endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 198-209, 2012.

CAPÍTULO 1 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

RESUMO

A família Orchidaceae é uma das maiores em número de espécies, com híbridos de diferentes características morfológicas. Entretanto, a germinação de suas sementes em ambientes naturais é dificultada, pois apresentam pouco tecido de reserva e muitas vezes necessitam de associação com fungos micorrízicos. Contudo, maiores percentuais de germinação são obtidos por meio da cultura *in vitro* quando comparados com as condições naturais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de cápsulas maduras e imaturas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, com a presença do ácido giberélico (AG₃). O trabalho foi dividido em dois experimentos: no primeiro os tratamentos constavam das concentrações de AG₃ de 0,0; 4,0, 8,0 e 16,0 mg L⁻¹ para germinação de sementes de cápsula imatura, no segundo experimento, os tratamentos foram determinados pelas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico para avaliar a germinabilidade de sementes de cápsulas maduras de *C. paludicolum*, sendo que em ambos experimentos, cada tratamento continha quinze repetições. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, concentrações de AG₃ e o tempo de incubação. Para as sementes de cápsula imatura apenas o tratamento com 16,0 mg L⁻¹ de AG₃ obteve germinação (61,06%), já para as sementes de cápsulas maduras, a germinação ocorreu em todos os tratamentos, porém inicialmente (trinta dias) a germinação foi estimulada pela presença de AG₃, enquanto que aos noventa dias o ácido giberélico causou efeito inibitório na germinação. A concentração de 10,0 mg L⁻¹ de AG₃ determina maiores valores de germinabilidade aos sessenta dias após a exposição das sementes ao meio de cultura, enquanto que os demais tratamentos apenas aos noventa dias de incubação das sementes. O ácido giberélico proporciona efeitos estimulatório e inibitórios em sementes de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, dependendo da maturidade fisiológica das sementes e do tempo de contato das sementes com o meio de cultura.

PALAVRAS-CHAVE: Orquídea, *In Vitro*, Giberelina.

CHAPTER 1 – EFFECT OF GIBBERELIC ACID ON SEED GERMINATION OF *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

ABSTRACT

The family Orchidaceae is one of the largest in number of species, with hybrids of different morphological characteristics. However, the germination of seeds in their natural environments is difficult, since they have little reserve tissue and often require association with mycorrhizal fungi. However, higher percentages of germination are obtained through *in vitro* culture compared to natural conditions. This study aimed to evaluate the *in vitro* germination of mature and immature seeds of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, with the presence of gibberellic acid (GA₃). The work was divided into two experiments: the first contained treatments of GA₃ with concentrations of 0.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mg L⁻¹

¹, for germination of immature capsule seeds from the second experiment, the treatments were determined by the concentrations of 0.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ gibberellic acid to evaluate the germination of mature seeds capsule of *C. paludicolum*, and in both experiments, each treatment consisted of fifteen repetitions. The experimental design was completely randomized, factorial, GA₃ concentrações and incubation time. To the immature seed capsule treatments with 16.0 mg L⁻¹ GA₃ obtained germination (61.06 %), while for the mature seeds capsule, germination occurred in all treatments, but initially (thirty days) germination was stimulated by the presence GA₃, while at ninety days, the gibberellic acid caused an inhibitory effect on germination. The concentration of 10.0 mg L⁻¹ GA₃ provides higher values of germination to sixty days after exposure of seeds to the culture medium, while the other treatments only ninety days of incubation on seeds. The gibberellic acid provides stimulatory and inhibitory effects on seeds *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, depending on the physiological maturity of the seeds and the time of contact with the seed culture medium.

KEY-WORDS: Orchid, *In vitro*, Gibberellin.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae compreende mais de 25.000 espécies e milhares de híbridos com diferentes características morfológicas como as formas e as cores das flores (CHASE et al., 2003; ROBERTS e DIXON, 2008). Nos últimos anos, o setor de produção de flores aumentou no Brasil e atingiu uma importância significativa no mercado internacional, sendo a produção *in vitro* de flores essencial para produzir plantas com maior qualidade e maior valor comercial (MATA-ROSAS et al., 2011). No entanto, o cultivo e o comércio de orquídeas no Brasil também aumentaram e têm sido baseados principalmente no extrativismo predatório, o qual, aliado ao aumento das fronteiras agrícolas e a contínua urbanização, propiciam para diversas espécies, iminente perigo de extinção (GALDIANO et al., 2013).

As sementes da família Orchidaceae apresentam-se desprovidas de tecido de reserva e são dependentes da associação com fungos micorrízicos para obter as moléculas de carbono e os minerais necessários à germinação e ao desenvolvimento do embrião (RAMOS, 1969; ARDITTI, 1979). Contudo, maiores percentuais de germinação são obtidos por meio da cultura *in vitro* quando comparados com as condições naturais. Assim, o cultivo *in vitro* é um

instrumento biotecnológico importante na obtenção de um número significativo de mudas uniformes, além de propiciar plantas livres de doenças e pragas (SOARES et al., 2012).

A espécie *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne possui plantas típica de áreas brejosas, com pseudobulbos alongados de 10 a 40 cm de altura, inflorescência simples ou pouco ramificada atingindo até 2 m de altura, suas flores estão entre as maiores do gênero com 3,5 a 3,8 cm de diâmetro, florescendo no período que começa em dezembro e termina em abril. Esta ocorre no Cerrado, no Distrito Federal e nos estados do Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (BARROS et al., 2013)

As giberelinas são hormônios vegetais bioquimicamente caracterizados como ácidos diterpenóides tetracíclicos (CID, 2000) que possuem efeito estimulatório no processo germinativo, quando aplicadas em sementes com e sem dormência. Segundo Copeland e McDonald (1995), existe um grande número de giberelinas que promovem a germinação de sementes, mas a forma mais frequentemente utilizada é o ácido giberélico (AG₃). No que se refere à germinação de sementes, Metivier (1986) ressalta o papel dos ácidos giberélicos no controle da hidrólise do tecido de reserva para o fornecimento de energia ao embrião, promovendo, de acordo com Salisbury e Ross (1992), o alongamento celular, fazendo com que a radícula se desenvolva através do endosperma ou tegumento. As giberelinas podem induzir genes que codificam enzimas que reduzem a resistência mecânica dos envoltórios da semente ou ter efeito direto sobre o potencial de crescimento do embrião (KERBAUY, 2008).

Em espécies de orquídeas terrícolas, há relatos de maiores percentuais de germinação *in vitro* quando as sementes são induzidas em fase imatura (MITCHELL, 1989; DEPAUW e REMPHREY, 1993; RASMUSSEN, 1995; LIGHT e MACCONAILL, 1998), porém, Arditti e Ernest (1993) indicam que as espécies com habitat terrestre, germinam e se desenvolvem "*in vitro*" mais lentamente do que as epífitas. Entretanto, não foram elucidadas as razões para o aumento da frequência de germinação de sementes imaturas de espécies terrícolas da família Orchidaceae. A fim de elucidar melhores mecanismos de germinação dessa espécie, objetivou-se avaliar a porcentagem de germinação

de sementes de cápsulas maduras e imaturas de *C. paludicolum in vitro* em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) no Campus de Chapadão do Sul.

2.2 Material Vegetal

Foram utilizadas como material de estudo sementes oriundas de cápsulas maduras e imaturas de *Cyrtopodium paludicolum* coletadas em área de preservação permanente da Fazenda Cachoeira em Chapadão do Sul - MS, em conformidade com a autorização SISBIO número 22570-2.

2.3 Germinação de sementes de cápsula imatura

Uma cápsula imatura, com aproximadamente 90 dias após a antese, foi transferida para a capela de fluxo laminar e submetida à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), durante 15 minutos. Logo em seguida, o excesso do hipoclorito de sódio foi retirado, fazendo-se três imersões em recipientes contendo água destilada e autoclavada. Realizada a assepsia, as sementes foram inoculadas com auxílio de swab estéril (Labor Swab®), em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Knudson (KNUDSON, 1946), suplementado com 20,0 g L⁻¹ de sacarose, 4,0 g L⁻¹ de Agar e diferentes concentrações de ácido giberélico (0,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, em seguida, foi esterilizado a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos.

Após a semeadura, as placas foram vedadas com filme plástico PVC (Dispafilm do Brasil Ltda) e acondicionadas em sala de crescimento a 23 ± 2°C

e fotoperíodo de 16 horas com $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas (40W, Philips, extra luz do dia).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (concentrações de AG_3) e quinze repetições cada, sendo cada repetição representada por uma placa com campo de leitura fixado em 27,0 mm. Para as leituras, foi utilizado um estereomicroscópio binocular (Didática sp) no qual foram observadas a porcentagem de germinação sendo consideradas sementes germinadas aquelas que se apresentavam intumescidas e clorofiladas. A porcentagem de germinação foi calculada considerando-se o número de sementes germinadas sobre o número total de sementes no respectivo campo de leitura.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das concentrações de AG_3 foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Germinação de sementes de cápsula madura

Os procedimentos de desinfestação e esterilização da cápsula madura, com aproximadamente 150 dias após a antese, foram os mesmos utilizados para cápsula imatura, assim como a montagem e preparação do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de quatro concentrações de ácido giberélico (AG_3): 0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L^{-1} e três tempos de avaliação (30, 60 e 90 dias).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um esquema de parcelas subdivididas, com quinze repetições, sendo cada repetição representada por uma placa com campo de leitura definido com 27,0 mm de diâmetro. As leituras foram realizadas utilizando estereomicroscópio binocular (Didática sp). Foi avaliada a porcentagem de germinação, sendo consideradas sementes germinadas aquelas que se apresentavam intumescidas e clorofiladas. A porcentagem de germinação foi calculada considerando-se o número de sementes germinadas sobre o número total de sementes no respectivo campo de leitura.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de germinação para os três tempos foram comparadas pelo teste de

Tukey a 5% de probabilidade. A análise de regressão foi utilizada para verificar o ajuste de modelos polinomiais para variáveis dependentes, em função das concentrações de AG₃, em nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação de sementes de cápsula imatura

A análise de variância dos dados de germinação de sementes de cápsula imatura mostrou que houve significância para o percentual de germinação quanto às concentrações de giberelina. A presença de 16,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) resultou em 61,06 % de germinação das sementes de cápsula imatura de *C. paludicolum*. Nos demais tratamentos a presença de giberelina foi insuficiente para promover o processo germinativo (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação de sementes de cápsula imatura de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃) após 120 dias de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.

AG ₃ (mg L ⁻¹)	Germinação (%)
0,0	0,00 b
4,0	0,00 b
8,0	0,00 b
16,0	61,06 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Rasmussen (1995), Yamazaki e Miyoshi (2006) observaram que a medida que ocorre a maturação das cápsulas de *Cyrtopodium* spp. e *Cephalanthera falcata*, diminui-se a capacidade de germinação. Lee et al., (2005) sugere que sementes de *Cyrtopodium formosanum* podem apresentar dormência primária, pois a germinação é melhor em sementes imaturas, assim como para muitas outras espécies de orquídeas terrícolas, também foram obtidas maiores porcentagens de germinação *in vitro* em cápsulas imaturas do que em sementes maduras (MITCHELL, 1989; DEPAUW e REMPHREY, 1993; LIGHT e MACCONAILL, 1998).

No entanto, os dados do presente trabalho demonstraram que, para cápsulas imaturas, as sementes de *C. paludicolum* germinam apenas quando se utilizou a dosagem de 16,0 mg L⁻¹ de AG₃

Essa taxa de germinação pode estar relacionada ao fato de que a dormência foi induzida por mudanças fisiológicas durante o desenvolvimento e maturação das sementes, como o acúmulo de ácido abscísico. A relação neste caso é a biossíntese de ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA), os quais são antagônicos por possuírem o mesmo precursor. Normalmente o ABA se encontra em maior concentração nas sementes imaturas e à medida que estas são lançadas no ambiente em condições favoráveis o GA, inverte-se esse balanço e a germinação acontece. Assim foi verificado em *Dactylorhiza maculata* e *Epipactis helleborine* por Van Der Kinderen (1987). Outro fator correlacionado à dormência das sementes são as substâncias inibidoras de germinação, tais como compostos fenólicos, fato observado na germinação de *Cymbidium goeringii* (KAKO, 1976).

Porém, a indução de um estado fisiológico de dormência em embriões, pode ser devido ao aumento da impermeabilidade dos embriões durante a maturação da semente (MIYOSHI e MII, 1988).

As giberelinas são relatadas como benéficas à quebra de dormência embrionária (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; JESUS et al., 2003) ou tegumentar de muitas espécies vegetais (KERBAUY, 2008), corroborando com os resultados observados neste trabalho, em que o efeito estimulatório de AG₃ foi determinante na germinação de sementes de cápsula imatura de *C. paludicolum*.

Pierce e Cerabolini (2011) relataram que a presença de fitorreguladores como a giberelina, aumentou significativamente a germinação das sementes imaturas de *Pseudorchis albida* e promoveu o desenvolvimento de protocormos. Assim também, as sementes de cápsula imatura de *C. paludicolum* necessitam de uma quantidade expressiva de ácido giberélico armazenado para que ocorra a estimulação da germinação, pois, fisiologicamente, os hormônios podem ser acumulados para a sua subsequente participação no controle da germinação e crescimento da plântula ou podem estar relacionados com o desenvolvimento das sementes (BEWLEY e BLACK, 1983).

3.2 Germinação de sementes de cápsula madura

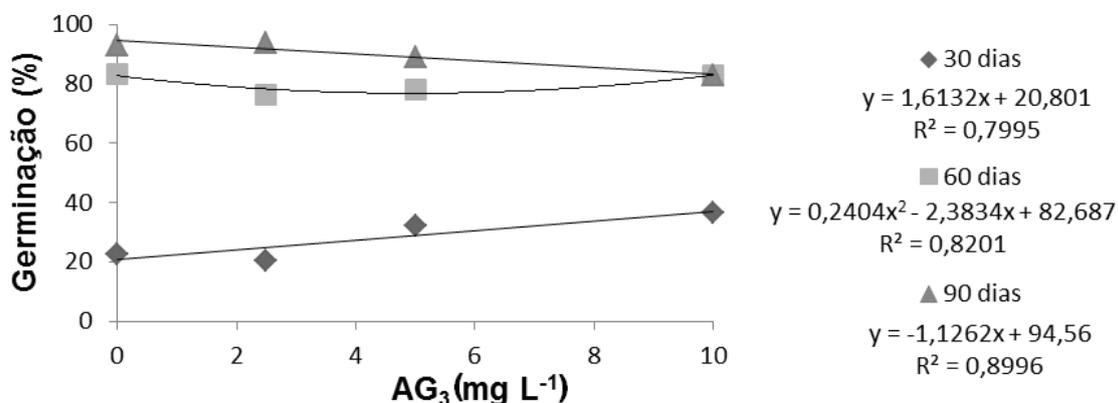
Houve interação significativa entre as concentrações de AG₃ e o tempo de exposição ao meio. Na interação concentração dentro de tempo, aos 30 dias após a incubação das sementes de cápsulas maduras, houve efeito linear positivo na germinação das sementes de cápsulas maduras de *C. paludicolum* (Figuras 1 e 2), porém, com apenas 36,9% de germinação na concentração de 10 mg L⁻¹ de AG₃. A promoção de germinação decorrente da aplicação de AG₃ também foi observada por Santos et al. (2007) em sementes de *Cattleya bicolor*.

Aos 60 dias após a incubação das sementes de *C. paludicolum* no meio de cultura, observou-se que a presença de giberelina nas concentrações avaliadas apresentou pouco efeito estimulatório na germinação, porém, os dados observados por Soares et. al. (2012), demonstraram que a presença do ácido giberélico (AG₃) não exerceu efeito estimulante sobre a germinação e formação protocormos de sementes de *Dendrobium nobile* Lindl.

Após 90 dias, verificou-se redução na germinação com uso de AG₃ (Figura 1) demonstrando que na presença de giberelina houve diminuição da porcentagem de germinação das sementes maduras de *C. paludicolum*, corroborando com o relato de Cevdet e Sebnem (2012), em que a germinação de sementes de *Serapias vomeracea* foi afetada negativamente com o acréscimo de AG₃.

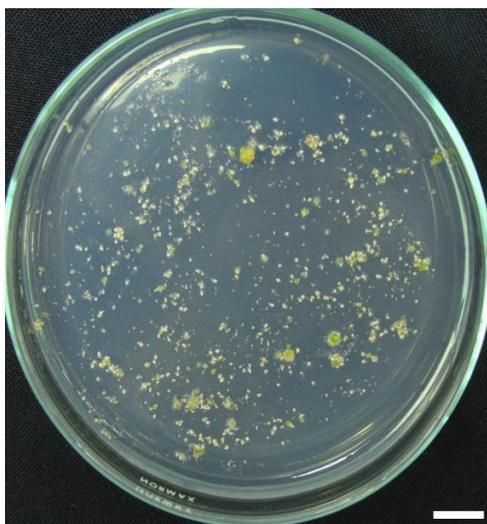
As sementes podem ser muito sensíveis ao AG₃ na fase inicial de germinação, uma vez que, extrapolado o tempo do efeito estimulatório, então, o processo inibitório se instala, fato este também observado em sementes de *Calanthe discolor* (MIYOSHI e MIL, 1995). Apesar do baixo percentual de germinação em alguns tratamentos, as sementes de *C. paludicolum* germinaram em todas as concentrações de AG₃, assemelhando-se aos resultados obtidos por Leite e Hebling (2007), os quais verificaram que a utilização de 1 mg L⁻¹ de AG₃ na embebição de sementes de *Cattleya bicolor* proporcionou o maior número de plântulas.

Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes oriundas de cápsulas maduras de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (AG₃) e tempo de avaliação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.



A aplicação de fitorreguladores que propiciam a germinação de sementes de espécies vegetais nativas é de extrema importância, e o uso do ácido giberélico tem sido fundamental, pois está relacionado com a síntese de enzimas hidrolíticas como proteases e α -amilases que degradam reservas como amido e proteínas, as quais são usadas no desenvolvimento do embrião e também no alongamento da radícula (TAIZ e ZEIGER, 2013; FERREIRA et al., 2001).

Figura 2. Germinação de sementes oriundas de cápsula madura de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. Barra = 1 cm. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.



Embora a utilização de determinadas concentrações de AG₃ em certos períodos tenha sido inibitória para sementes de *C. paludicolum*, Gil-Martínez (1995) afirma que, em condições naturais, as sementes de Orchidaceae podem precisar de AG₃ fornecido pelo fungo micorrízico, a fim de iniciar o processo germinativo. Esta é possivelmente a relevância do ácido giberélico quando adicionado em meios assimióticos, os quais substituem as associações micorrízicas, conforme relato de Pedroza et al. (2005), para a germinação de *Compartmentia falcata*.

Na interação tempo de incubação dentro de tratamento verificou-se que as concentrações de 0,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de AG₃ aos 90 dias após a incubação das sementes de *C. paludicolum* no meio de cultura, apresentaram maior porcentagem de germinação do que aos 30 e 60 dias, diferenciando-se estatisticamente. Já para o tratamento com 10,0 mg L⁻¹ de giberelina não houve diferença estatística na porcentagem de germinação aos 60 e 90 dias de incubação, os quais foram maiores que aos 30 dias, diferindo deste estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de germinação de sementes de cápsulas maduras de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃) sob diferentes tempos de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.

Tempo	Ácido giberélico (mg L ⁻¹)			
	0,0	2,5	5,0	10,0
30 dias	22,6 c	20,2 c	32,2 c	36,4 b
60 dias	83,4 b	76,3 b	80,2 b	82,7 a
90 dias	92,9 a	93,9 a	89,0 a	83,3 a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

Alguns autores que trabalharam com germinação de sementes da família Orchidaceae em diferentes tempos de incubação de sementes, conseguiram resultados alternados, como Leite e Hebling (2007) que obtiveram 52,49% germinação trabalhando com *Cattleya warnerii* avaliadas após quarenta e cinco dias de incubação, Schneiders et. al. (2012) obtiveram 90% de germinação ao avaliar sementes de *Cattleya forbesii* aos 30 dias após a incubação e Soares et. al. (2012) após seis meses obtiveram 49,47% de

germinação com sementes de *Dendrobium nobile* Lindl. Esses resultados demonstram que as respostas fisiológicas a germinação de cada espécie variam de acordo com o tempo exposto ao meio de cultura.

4. CONCLUSÕES

Sementes de cápsula imatura de *C. paludicolum* mostraram-se dependentes de AG₃ para germinar;

O aumento das concentrações de ácido giberélico no meio de cultura aos 30 dias induz a germinação, porém aos 90 dias de incubação das sementes de cápsulas maduras de *C. paludicolum*, concentrações elevadas de AG₃ causam efeito inibitório na germinabilidade;

O tempo de incubação influencia a germinabilidade de sementes de cápsulas maduras de *C. paludicolum*, sendo o tempo de 90 dias o mais adequado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J. Aspects of the physiology of orchids. **Advances in Botanical Research**. Academic Press, California, v.7, p.421-655, 1979.

ARDITTI, J.; MICHAUD, J. D.; OLIVA, A. P. Practical germination of North American and related orchids: *Epipactis atrorubens*, *E. gigantea* and *E. helleborine*. **American Orchid Society Bulletin**, Florida, v.51, n.2, p.162–171, 1982.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York, John Wiley e Sons, 1993. 640p.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. 2013. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11443>. Acesso em 20 de ago. 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Springer-Verlag, Berlin, vol.50, p.132-171, 1983.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; BARRETT, R.S.; FREUDENSTEIN J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K. W.; KELL, S. P., BARRETT, R. L.; CRIBB, P. J., Ed(s). **Orchid**

Conservation Natural History Publications. Kota Kinabalu, Sabah, 2003. p.69-89.

CEVDET, G.; SEBNEM, E. Seed germination and development of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter in tissue culture. **Research Journal of Biotechnology**, India, v.7, p.4-8, 2012.

CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais.** Brasília, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Seed science and technology.** Chapman e Hall, New Jersey, USA, 1995. 409p.

DEPAUW, M. A.; REMPHREY, W. R. *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.7, n.1, p.879–885, 1993.

FERREIRA, G.; SEIDEL, G. O.; VERONA, M. M. Efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.). In: Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, VIII. **Anais: CNFV**, Ilhéus – BA, 2001.

GALDIANO, R. F. Jr.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. de; LEMOS, E. G. de M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.1, p.583-591, 2013.

GIL-MARTÍNEZ, F. **Elementos de fisiología vegetal.** España: Mundi-Prensa, 1995. 1147p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.50, n.288, p.183-9, 2003.

KAKO, S. Study on the germination of seeds of *Cymbidium goeringii*. In: TORIGATA H (Ed). **Seed formation and sterile culture of orchids.** Tokyo, Seibundoshinkosha, 1976. p.174–237.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2008. 431p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.14, p.214-217, 1946.

LEE, Y. I.; LEE, N.; YEUNG, E. C.; CHUNG, M. C. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*. **J. American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.130, p.747–753, 2005.

LEITE, V. C. A.; HEBLING, S. A. Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. **Natureza on line**, v.5, n.2, p.55-62, 2007. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_LeiteVCA_Hebling_SA_5562.pdf. Acessado em 23 de ago. de 2013.

LIGHT, M. H. S.; MACCONAILL, M. Factors affecting germinable seed yield in *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Wild.) Correll and *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.126, n.1-2, p.3–26, 1998.

MATA-ROSAS, M.; BALTAZAR-GARCIA, R. J.; CHAVEZ-AVILA, V. M. *In vitro* regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave e Lex. (Orchidaceae), endemic and threatened mexican species. **HortScience**, v.46, n.8, p.1132-1135, 2011.

METIVIER, J. R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 2ed, São Paulo: EDUSP, v.2, p.93-162, 1986.

MITCHELL, R. B. Growing hardy orchids from seeds at Kew. **The Plantsman**, v.1, n.1, p.152–169, 1989.

MIYOSHI, K.; MII, M. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, Philadelphia, v.35, p.127–130, 1988.

MIYOSHI, K.; MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, Philadelphia, v.63, n.3-4, p.263-7, 1995.

PEDROZA, J.; FERNÁNDEZ, C.; SUÁREZ, A. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v.41, p.838-43, 2005.

PIERCE, S.; CERABOLINI, B. E. L. Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones. **Seed Science and Technology**, Cambridge, v.39, p.199–203, 2011.

RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução por semente**. São Paulo: Ed. Saraiva, 1969. 163p.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 460p.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, London, v.18, n.8, p.325-329, 2008.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California, Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **Cesumar**, Marília, v.9, p.07-12, 2007.

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

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.617-623, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

VAN DER KINDEREN, G. Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. **Lindleyana**, Estados Unidos, v.2, p.84-87, 1987.

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

CAPÍTULO 2 – FONTE DE CARBONO NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

RESUMO

A família Orchidaceae é representada por plantas com flores diversificadas, a qual é composta também pelo gênero *Cyrtopodium* R. Br. A propagação em larga escala de várias espécies de orquídeas tem sido atribuída ao cultivo *in vitro*, onde as plantas passam a ser praticamente heterotróficas e assim requerem de uma fonte exógena de carboidratos. Portanto, objetivou-se com este estudo obter a melhor concentração de carboidratos e fonte de carbono para o crescimento vegetativo *in vitro* de plantas de *Cyrtopodium paludicolum*. Foram utilizados quatro carboidratos diferentes: sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), glicose ($C_6H_{12}O_6$), frutose ($C_6H_{12}O_6$) e rafinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) nas concentrações de 0, 10, 20 e 40 g L⁻¹, adicionados em meio Knudson. Os materiais vegetais utilizados foram protocormos, os quais permaneceram durante 90 dias no meio de cultivo, em seguida foram avaliados altura da parte aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e peso total de matéria fresca. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial com cinco repetições. Para a altura da parte aérea, na concentração de 10 g L⁻¹, a sacarose mostrou-se vantajosa, porém na concentração de 40 g L⁻¹ não houve diferença entre as fontes de carboidratos. Para comprimento da maior raiz, número de folhas e matéria fresca, a glicose e sacarose demonstraram-se mais eficientes nas concentrações de 25,0 a 32,0 g L⁻¹. Os tipos de carboidratos influenciaram o crescimento *in vitro* de *C. paludicolum*, no entanto, é recomendável sacarose ou glicose como fontes de carbono, nas concentrações de 25 a 32 g L⁻¹ para o desenvolvimento vegetativo da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, Desenvolvimento, Açúcares.

CHAPTER 2 - CARBON SOURCE ON *IN VITRO* CULTURE OF *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

ABSTRACT

The orchid family is represented by flowering plants diversified, which is also composed by genus *Cyrtopodium* R. Br. Large scale propagation of various species of orchids has been attributed to culture *in vitro*, where plants are to be practically heterotrophic and thus require an exogenous source of carbohydrates. Therefore, the aim of this study was to obtain the best carbohydrate concentration and carbon source for *in vitro* vegetative growth of *C. paludicolum*. We used four different carbons: sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), glucose ($C_6H_{12}O_6$), fructose ($C_6H_{12}O_6$) and raffinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) at concentrations of 0, 10, 20 and 40 g L⁻¹, added culture medium of Knudson. The plant material were protocorms which remained for 90 days in the culture medium, then were evaluated shoot height, number of leaves, number of roots, length of roots and total weight of fresh matter. For the shoot height, the concentration of 10 g L⁻¹ sucrose proved advantageous, but at a concentration of 40 g L⁻¹ there was no difference between the carbon sources. For the longest root length, number of leaves and fresh weight, glucose and sucrose were shown to be more efficient

at concentrations from 25.0 to 32.0 g L⁻¹. The types of carbohydrate affected the *in vitro* growth of *C. paludicolum*, however, it is recommended sucrose or glucose as carbon sources at concentrations 25 to 32 g L⁻¹ for the vegetative species.

KEY WORDS: Orchidaceae, Development, Sugars.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é representada por plantas com flores diversificadas, as quais são valorizadas devido a sua beleza e duração, assim, exibem ampla diversidade em tamanho, fragrância e coloração (ROBERTS e DIXON, 2008). O gênero *Cyrtopodium* R. Br. é composto por 39 espécies da família Orchidaceae. *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne é uma espécie caracterizada pela inflorescência geralmente simples, alta e com flores grandes, principalmente amarelas com pseudobulbos de tamanho mediano (BARROS et al., 2013).

A propagação em larga escala de várias espécies de orquídeas em risco de extinção ou de elevado valor comercial tem sido atribuída ao cultivo *in vitro* (SANTOS et al., 2006). Assim, os meios assimbióticos são capazes de propiciar a germinação e também possibilitam o crescimento e o desenvolvimento das muitas espécies de orquídeas cultivadas (SOARES et al., 2013). Para tal, o estabelecimento das exigências dos meios nutritivos empregados na cultura de tecidos vegetais foi estabelecido a partir das exigências das plantas inteiras, com modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Desta forma, vários constituintes são acrescentados para suprir as necessidades energéticas, metabólicas e estruturais da célula, uma vez que as mesmas vias bioquímicas básicas que operam nas plantas são mantidas nos tecidos cultivados *in vitro* (STANCATO et al., 2008).

No cultivo *in vitro*, as plantas passam a ser praticamente heterotróficas e, portanto, requerem fonte exógena de carboidratos para o desenvolvimento quando em condições desfavoráveis para realização da fotossíntese (KOZAI et al., 1991). Essas fontes são adicionadas ao meio nutritivo, fornecendo energia metabólica e esqueletos carbônicos para a síntese de compostos orgânicos,

como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998).

A redução de carboidratos para o cultivo assimbiótico tem sido pesquisada a fim de melhorar a capacidade fotossintética dos tecidos cultivados *in vitro* e reduzir perdas atribuídas à contaminação por fungos e bactérias que, conseqüentemente, interferem negativamente na sobrevivência e no desenvolvimento das plântulas (KOZAI et al., 1991). Entretanto, há autores não favoráveis a esta teoria, os quais relatam não estarem definidos os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização, portanto, seria necessário manter os níveis de sacarose em torno de 2 - 3% na fase que antecede a aclimatização para que a planta acumule reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente (CAPELLADES et al., 1990; REZENDE et al., 2009).

A sacarose é o carboidrato mais empregado em meios de cultura na propagação de plantas ornamentais, sendo que no meio Knudson (KNUDSON, 1946), sua concentração mais utilizada é de 20,0 g L⁻¹ (FRAGUAS et al., 2003). No cultivo *in vitro* de orquídeas, porém, há fontes alternativas que também têm sido utilizadas com menor frequência como a frutose, glicose, maltose, entre outras (REGO-OLIVEIRA et al., 2003; BESSON et al., 2010). A concentração e fonte apropriada de carbono dependem principalmente da espécie vegetal e da fase do desenvolvimento em que a planta se encontra (NICOLOSO et al., 2003).

Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo *in vitro* de plantas de *C. paludicolum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) no Campus de Chapadão do Sul.

2.2 Material vegetal

Foram utilizados protocormos provenientes de sementes de *C. paludicolum*, que já se encontravam estabelecidos *in vitro* em meio Knudson (KNUDSON, 1946). Para estabelecimento da estrutura de protocormos, utilizou-se a definição de Harrison (1977), o qual relata protocormo como uma estrutura tuberiforme resultante da germinação das sementes.

2.3 Fontes de carbono e concentrações de carboidratos

O meio de cultura utilizado foi o de Knudson (KNUDSON, 1946), suplementado com 4,0 g L⁻¹ de Agar. Foram utilizadas quatro fontes de carbono: sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁), glicose (C₆H₁₂O₆), frutose (C₆H₁₂O₆) e rafinose (C₁₈H₃₂O₁₆), nas concentrações de 0, 10, 20 e 40 g L⁻¹. Em seguida, o pH dos meios de cultura foram ajustado para 5,8 ± 0,1.

Após o preparo, 50 mL de meio foram distribuídos em frascos de vidro de 250 cm³ e em seguida vedados com papel alumínio e submetidos ao processo de esterilização por autoclavagem a 120°C durante 20 minutos. A inoculação foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar, sendo utilizados quatro protocormos por repetição. Posteriormente, os frascos foram vedados com filme plástico PVC (Dispafilm do Brasil Ltda) e acondicionados em sala de crescimento a 27 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas com 28 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiância, provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas (40W, Philips, extra luz do dia).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma média de quatro plantas em cada frasco. Após 90 dias foram efetuadas avaliações dos seguintes parâmetros: altura da parte aérea, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz e peso total de matéria fresca.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as medias das fontes de carboidratos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de regressão foi utilizada para verificar o ajuste

de modelos polinomiais para variáveis dependentes, em função das concentrações de fontes de sacarose, em nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de raiz, comprimento da maior raiz, número de folhas e massa fresca não tiveram interação significativa entre as fontes de carbono e as concentrações testadas. Apenas houve interação para a altura da parte aérea, na qual a comparação entre as fontes de carbono demonstrou que a sacarose diferiu dos demais tratamentos na concentração de 10,0 g L⁻¹ apresentando plantas com 33,8 mm de altura. Já para a concentração de 20,0 g L⁻¹, a rafinose demonstrou menor efeito no crescimento da parte aérea (11,7 mm), diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos. Nas demais concentrações não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Altura da parte aérea (mm) de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne em função de diferentes fontes de carbono e concentrações destas no meio de cultivo, após 90 dias de incubação. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.

Fonte de carbono	Concentrações (g L ⁻¹)			
	0	10	20	40
Sacarose	0,0 a	33,8 a	24,8 a	18,9 a
Glicose	0,0 a	18,8 b	28,1 a	13,8 a
Frutose	0,0 a	18,2 b	25,5 a	16,9 a
Rafinose	0,0 a	10,2 b	11,7 b	16,4 a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A sacarose proporcionou crescimento em altura 79,8% superior a segunda maior altura obtida que foi com glicose, na concentração de 10 g L⁻¹, já a rafinose na concentração de 20 g L⁻¹ apresentou crescimento em altura da parte aérea 123% inferior a média dos melhores tratamentos.

Rego-Oliveira et al. (2003) relataram que para plântulas de *Oncidium varicosum*, até a concentração de 30 g L⁻¹, a glicose e a sacarose demonstraram maior crescimento de parte aérea que a maltose.

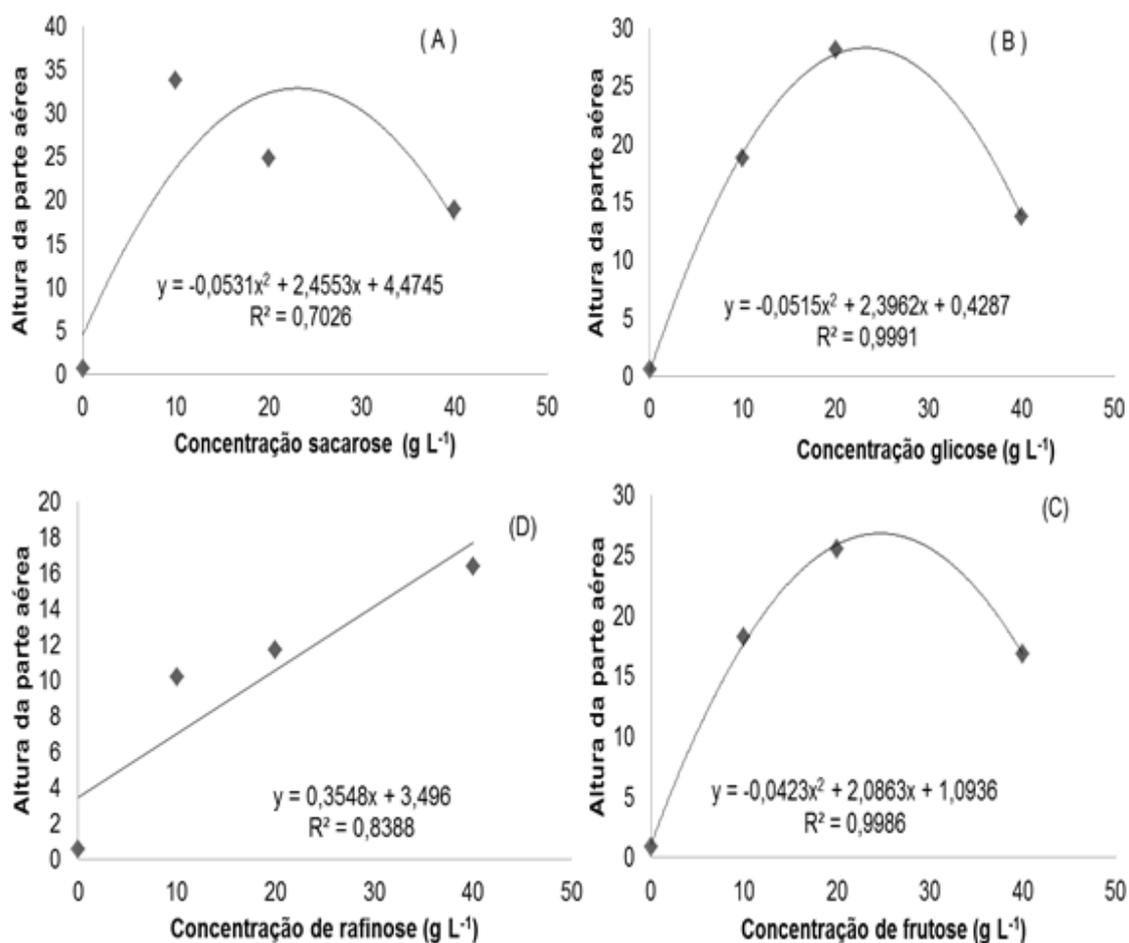
Quando comparadas as concentrações foi observada que, para sacarose, a concentração de 23,1 g L⁻¹ resultou em 32,9 mm de parte aérea, para glicose a concentração de 23,3 g L⁻¹ resultou em 28,3 mm de parte aérea e para frutose a concentração de 24,7 g L⁻¹ resultou em 26,8 mm de parte aérea, já para rafinose a concentração que proporcionou maior altura de parte aérea em plantas de *C. paludicolum* foi 40 g L⁻¹, apresentando linearidade positiva com a concentração adicionada ao meio, mesmo assim, atingindo a altura máxima de apenas 17,7 mm (Figura 1). Rego-Oliveira et al. (2003), comparando as concentrações de diferentes fontes de carbono no crescimento vegetativo de plântulas de *O. varicosum* observaram que, para glicose, a concentração que proporcionou maior altura de parte aérea foi 30 g L⁻¹ e para maltose e sacarose, a concentração que proporcionou maior altura de parte aérea foi 60 g L⁻¹. Já em espécies *Dactylorhiza*, há diferenças estatisticamente significativas na parte aérea e crescimento da raiz, dependendo do açúcar e das combinações de reguladores de crescimento utilizadas. Para *Dactylorhiza incarnata* ssp. *incarnata*, a maior taxa de crescimento de parte aérea e raízes foi obtido na presença de 40 g L⁻¹ glicose, já para *Dactylorhiza majalis*, a melhor estratégia para estimular o desenvolvimento das plantas foi a aplicação concomitante de glicose com sacarose na concentração de 10 g L⁻¹ cada (WOTAVOVÁ-NOVOTNÁ et al., 2007).

As fontes de carboidrato são adicionadas ao meio nutritivo para fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos, os quais sintetizam compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998). Os dados obtidos neste trabalho corroboram com o relato de Rego-Oliveira et al. (2003), que ressaltaram que as diferenças de altura da parte aérea evidenciam a importância do tipo de carboidrato a ser utilizado, assim como a sua concentração adequada, para o desenvolvimento de vitroplantas.

Para o comprimento de maior raiz, a sacarose proporcionou maior valor para essa variável e, apesar de não diferenciarem-se estatisticamente quando se utilizou a glicose, resultou em raiz com comprimento de 45,1% superior (Tabela 2). Entretanto, deve-se considerar que a sacarose proporcionou comprimento da maior raiz 45,1% superior a glicose. Rego-Oliveira et al. (2003), relataram não haver diferença estatística entre glicose, maltose e sacarose no crescimento das raízes de *O. varicosum* na concentração de 20,0

g L^{-1} , mas nas concentrações de 10,0 e 30,0 g L^{-1} , os dados corroboram com os apresentados neste estudo, onde as melhores fontes de carbono para o crescimento das raízes foram a sacarose e a glicose.

Figura 1. Altura da parte aérea (mm) de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne após 90 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de sacarose (A), glicose (B), frutose (C) e rafinose (D). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.



Para número de folhas, o uso das fontes sacarose, glicose e frutose resultou em valores iguais estatisticamente, diferindo apenas da rafinose (Tabela 2). A média do número de folhas obtido para essas três fontes de carbono foi 57,4% superior ao obtido pela rafinose. Em plântulas do híbrido de *Laelia purpurata* Lindl var venosa X *Cattleya warneri* T. Moore alba (Orchidaceae), o tratamento com sacarose foi o que proporcionou maior número de folhas, quando comparado com diferentes concentrações de frutose (MOREIRA et al., 2007). Moreira et al. (2007) e Pivetta et al. (2010) obtiveram

melhores resultados quanto ao número de folhas, quando adicionaram 20,0 a 30,0 g L⁻¹ de sacarose ao meio de cultivo. No entanto, Chaves et al. (2005) avaliaram os meios de cultivo *in vitro* modificados, Murashige e Skoog (MS) e Knudson para plantas de *Laelia purpurata* var. Alba Coeruleia e verificaram que o meio Knudson incrementado com frutose como fonte de carbono, proporcionou incremento no número de folhas, assim como de raízes novas, indicando que a fonte de carbono pode estimular e/ou regular processos bioquímicos relacionados com a divisão e diferenciação celular.

Tabela 2. Comprimento da maior raiz, número de folhas e matéria fresca de plantas de *Cyrtopodium paludicolum* cultivadas em meio nutritivo contendo sacarose, glicose, frutose ou rafinose após 90 dias do início do experimento. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.

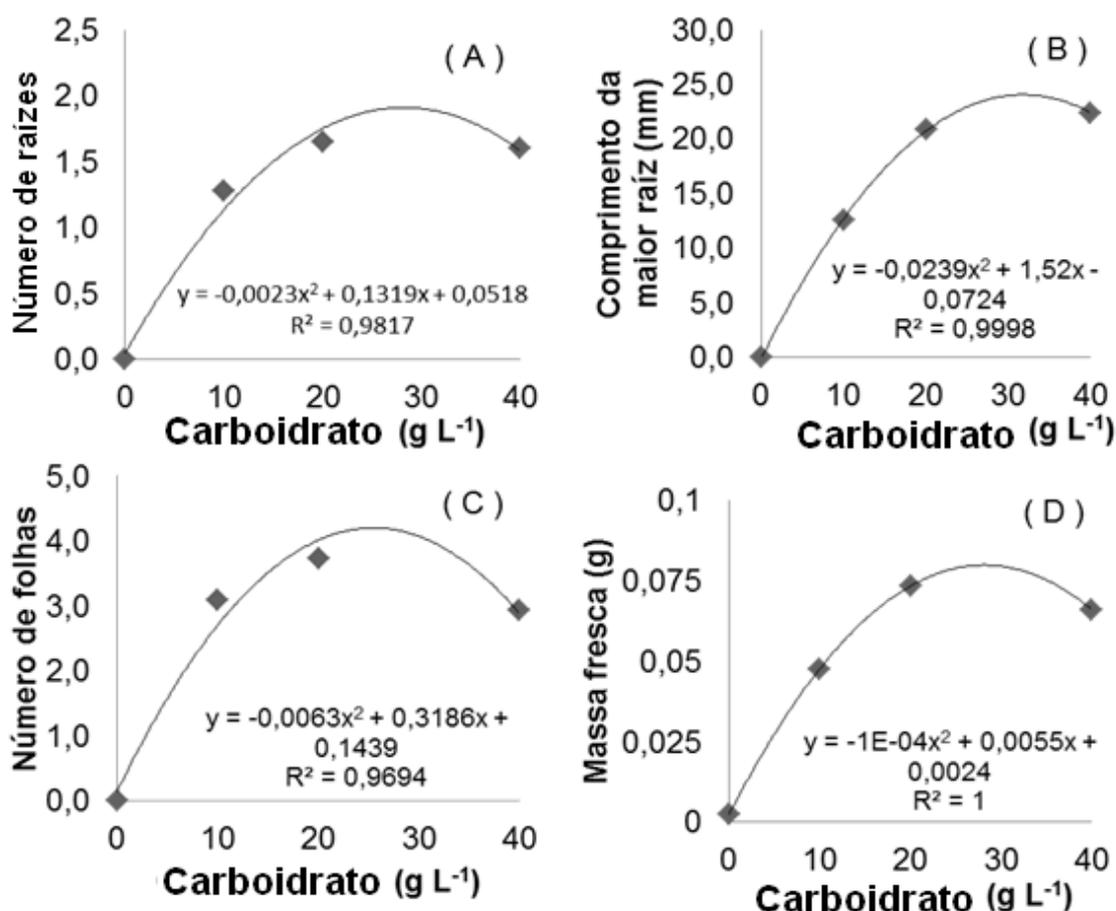
Fonte de Carbono	Comprimento maior raiz (mm)	Número de folhas	Matéria fresca (g)
Sacarose	19,3 a	27,4 a	0,063 a
Glicose	13,3 ab	26,7 a	0,048 ab
Frutose	12,2 b	26,2 a	0,052 ab
Rafinose	11,0 b	17,0 b	0,026 b

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Da mesma forma que foi observada para o número de folhas, a matéria fresca foi maior para as fontes de carbono sacarose, glicose e frutose, não diferindo estatisticamente entre si, apesar da massa fresca encontrada com sacarose ter sido 31,2 % superior a massa fresca obtida com glicose (Tabela 2). A média de massa fresca obtida com essas três fontes de carbono foi 109,0 % superior a obtida com rafinose. Rego-Oliveira et al. (2003) relataram não haver diferença estatística no peso fresco de *O. varicosum* entre as fontes de carbono testadas até a concentração de 30,0 g L⁻¹, no entanto, na concentração de 60 g L⁻¹, a glicose e a sacarose sobressaíram-se da maltose; porém, esta se destacou na concentração de 90 g L⁻¹. Segundo Caldas et al. (1990), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, proporcionando as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies de orquídeas.

Avaliando as variáveis em relação a concentração de carboidratos, observou-se que as plantas de *C. paludicolum* apresentaram melhores resultados concentração de 28,7 g L⁻¹ de carboidrato quanto ao número de raízes por planta, 31,8 g L⁻¹ de carboidrato para o comprimento da maior raiz, 25,3 g L⁻¹ quanto ao número de folhas por planta e 28 g L⁻¹ de carboidrato quanto à matéria fresca (Figura 2).

Figura 2. Resposta de número médio de raízes (A), comprimento médio de raízes – mm (B), número médio de folhas (C) e massa fresca – g (D), em função do aumento das concentrações de carboidratos em meio de cultivo, para plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.



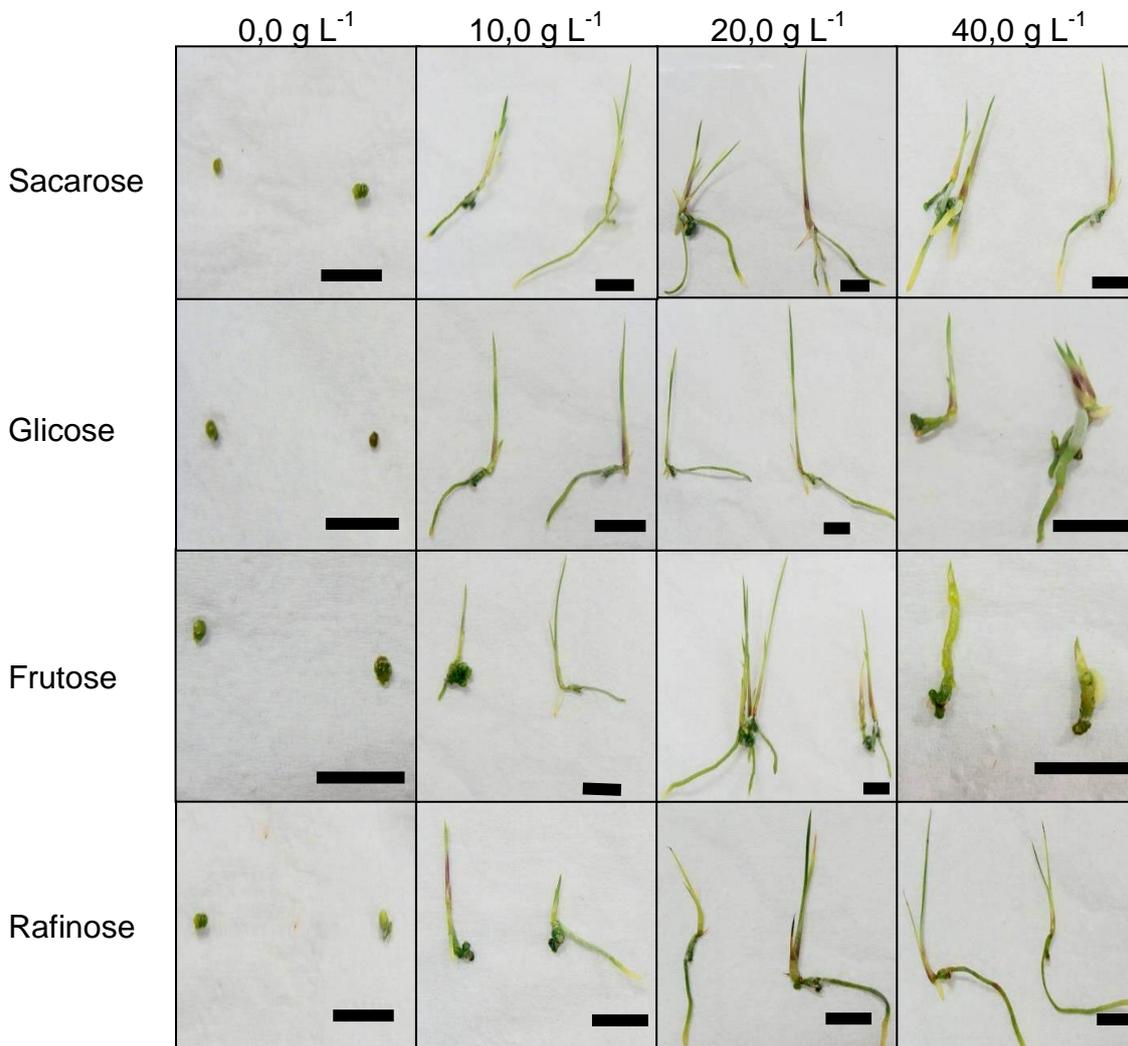
Com relação ao número de raízes, Moreira et al. (2007) verificaram que os tratamentos com 10 e 20 g L⁻¹ de açúcares apresentaram maior quantidade de raízes em híbridos de orquídeas. Já Rego-Oliveira et al. (2003) obtiveram

maior número de raízes nas concentrações entre 30 e 90 g L⁻¹ para *O. varicosum*. Collins e Dixon (1992), testaram concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 40 g L⁻¹) em *Diuris longifolia* R. Br., e observaram que o aumento das concentrações de 20 para 40 g L⁻¹ proporcionou aumento na frequência de enraizamento, dobrando o número de plantas enraizadas, demonstrando que o desenvolvimento radicular desta orquídea terrestre está diretamente ligado à concentração de sacarose no meio de cultura. Porém, segundo George e Sherrington (1984) e Faria et al. (2006), concentrações elevadas de açúcar podem inibir a formação de raízes *in vitro*.

Avaliando o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii*, Galdiano-Júnior et al. (2013) observaram que a concentração de 23 g L⁻¹ de carboidrato proporcionou maior comprimento de raízes. Portanto, com o aumento da concentração de açúcares proporciona diminuição da absorção de sais minerais e água e, isto pode interferir no crescimento vegetal (FRÁGUAS et al., 2003; BESSON et al., 2010). Paiva Neto e Otoni (2003) demonstram que o aumento na concentração de açúcares gera redução no potencial osmótico e conseqüentemente, no potencial hídrico do meio de cultura, culminando com menor disponibilidade de água e nutrientes.

Constatou-se bons resultados no desenvolvimento *C. paludicolum* com concentrações próximas a 30 g L⁻¹ para o número de raízes, comprimento de raízes, número de folhas e comprimento da parte aérea (Figura 3). Concentrações semelhantes foram propostas por Fráguas et al. (2003) para o híbrido *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*, Pivetta et al. (2010) para a orquídea amazônica *Caularthron bicornutum* e por Galdiano-Júnior et al. (2013a) para *Cattleya violacea*. Chu e Ribeiro (2002) observaram que o número de folhas de diferentes espécies de *Dioscorea* L. apresentou correlação positiva com a concentração de sacarose adicionada ao meio. Galdiano-Júnior et al. (2013a) observaram que durante o período de multiplicação de orquídeas, as concentrações entre 20 e 30 g L⁻¹ de carboidratos no meio de cultura tiveram um efeito positivo no peso final das plântulas, porém, Rego-Oliveira et al. (2003) observaram em *O. varicosum* melhores resultados de matéria fresca a partir de 60 g L⁻¹.

Figura 3. Plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne após a exposição a diferentes fontes e concentrações de carboidratos. Barra: 1 cm. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul - MS, 2013.



A exposição às fontes de carbono pode aumentar as reservas de amido e sacarose nas plantas e favorecer a aclimatização assim como favorecer as adaptações fisiológicas (HAZARIKA, 2003). No entanto, as plantas podem apresentar redução na atividade fotossintética, possivelmente devido à presença de fonte de energia suficiente para as demais atividades metabólicas (ROLLAND et al., 2002). Contudo, pode-se afirmar que as fontes de carbono e suas concentrações afetam cada espécie de forma distinta, proporcionando resultados suficientes ou insuficientes para o crescimento vegetativo (Figura 3).

4. CONCLUSÕES

As fontes de carbono e concentrações de carboidratos influenciaram o crescimento *in vitro* de *C. paludicolum*. O cultivo de *C. paludicolum* na presença de 10,0 e 20,0 g L⁻¹ de sacarose e 20,0 g L⁻¹ de glicose resultou em maior comprimento da parte aérea. Para comprimento da maior raiz, número de raiz, número de folhas e matéria fresca, as fontes de carbono demonstraram-se mais eficientes nas concentrações de 25,0 a 32,0 g L⁻¹.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. 2013. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11443>. Acesso em 20 de ago. 2013.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, p.9-13, 2010.

CALDAS, L. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.340-345.

CALDAS, L. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.87-132.

CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells of tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, p.141-145, 1990.

CHAVES, T. O.; DUCCA, F.; CARVALHO, V. M.; ZONETTI, P. C. Avaliação dos meios nutritivos Murashige & Skoog (MS) e "C" de Knudson modificados no cultivo *in vitro* de *Laelia purpurata* var. alba Coeruleia. In: ENCONTRO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR, 4. **Anais**. Maringá, EPCC. 2005.

CHU, E. P.; RIBEIRO, R. C. L. F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose

and cytokinin concentrations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.70, p.241-249, 2002.

COLLINS, M. T.; DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R.Br. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Australia, v.32, p.131-135, 1992.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p.267-270, 2006.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.50, p.719-726, 2003.

GALDIANO- JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. de; LEMOS, E. G. de M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.1, p.583-591, 2013.

GALDIANO-JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, Manaus, v.43, p.127-134, 2013a.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.

HARRISON, C. R. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, Chicago, v.138, p.41-45, 1977.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v.85, p.1704-1712, 2003.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.14, p.214-217, 1946.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro**, Santiago, Chile, v.27, p.47-51, 1991.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lind. var. venosa x *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v.2, p.16-21, 2007.

NICOLOSO, F. T., ERIG, A. C., RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. A. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro

[*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.84-90, 2003.

PAIVA NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, Viçosa, v.97, p.193-202, 2003.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.1897-1902, 2010.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SACONATO, C.H. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina**, Londrina, v.24, p.265-272, 2003.

REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; SANTOS, F. C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. **Agrarian**, Dourados, v.2, p.99-114, 2009.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, London, v.18, n.8, p.325-329, 2008.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **Plant Cell**, v.14, p.185-205, 2002.

SANTOS, A. F.; VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; GOULART, M. S.; NOVAIS, R. F.; CECON, P. R.; TEIXEIRA, S. L.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, n.1, p.8-12. 2006.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, vol.31, n.1, p.63-67. 2013.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Instituto Agrônomo de Campinas, v.67, p.51-57, 2008.

WOTAVOVÁ-NOVOTNÁK; VEJSADOVÁ, H; KINDLMANN, P. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. **Plant Biology**, Barcelona, v.51, p.198-200, 2007.

CAPÍTULO 3 – INTERFERÊNCIA DE FITORREGULADORES NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

RESUMO

A expansão agrícola em áreas de Cerrado tem reduzido drasticamente as áreas de ocorrência de espécies nativas, incluindo as orquídeas que, sofrem ainda forte pressão de coleta extrativista. Assim, a obtenção de técnicas de multiplicação que visem conservação destas espécies torna-se imprescindível. Neste contexto, objetivou-se micropropagar plantas de *Cyrtopodium paludicolum* a partir de ápices radiculares. Para tal, foram utilizados dois fitorreguladores, ácido 1-naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) em diferentes concentrações: ANA (0,00; 0,25 e 0,50 mg L⁻¹) e TDZ (0,00; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹), adicionados em meio Knudson. Os explantes utilizados foram ápices radiculares com aproximadamente 1,0 cm, oriundo de vitroplantas de *C. paludicolum*, os quais permaneceram durante 120 dias no meio de cultivo. Em seguida foram avaliados quanto a porcentagem de sobrevivência, número de brotações, altura da parte aérea, número de raízes e comprimento da maior raiz. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com quatro repetições cada tratamento. Houve interação significativa entre as diferentes concentrações de ANA e TDZ, sendo que, há a necessidade da presença da auxina ou citocinina exógena para bons percentuais de sobrevivência. Para o número de brotações a presença de ANA foi determinante, ao contrário do observado quando se utilizou TDZ isolado, no entanto, a maior média foi observada quando associada 0,25 mg L⁻¹ de ANA com 0,50 mg L⁻¹ de TDZ. Para o comprimento de parte aérea o mesmo foi observado, sendo no tratamento com 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de TDZ a maior altura foi obtida, 42,50 mm. Para o número de raiz, a concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA quando associada com TDZ, demonstrou maior capacidade na indução para diferenciação em raízes, na qual observou-se a maior média (7,25) quando associada com 0,50 mg L⁻¹ de TDZ, porém não diferiu estatisticamente quando associada com 1,00 mg L⁻¹ de TDZ. Para o comprimento de maior raiz, observou-se que ao contrário das demais variáveis, a presença de TDZ foi fator determinante no crescimento radicular, no entanto o maior comprimento (32,50 mm) foi observado na interação de 0,25 mg L⁻¹ de ANA com 0,50 mg L⁻¹ de TDZ. Por fim, concluiu-se que a presença de ANA e TDZ são fundamentais na micropropagação de ápices radiculares de *C. paludicolum*, podendo ser obtido bons resultados na concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de TDZ.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, Thidiazuron, Ácido 1-Naftaleno Acético.

CHAPTER 3 - INTERFERENCE TO PLANT GROWTH REGULATORS IN MICROPROPAGATION OF *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

ABSTRACT

Agricultural expansion in areas of Cerrado has dramatically reduced the areas of occurrence of native species, including orchids, still suffer strong pressure from extractive collection. Thus, obtaining multiplication techniques aimed at conservation of these species becomes essential. In this context, the objective of plant micropropagation *Cyrtopodium paludicolum* from root tips. To this, two plant growth regulators 1-naphthalene acetic acid (NAA) and thidiazuron (TDZ) were used in different concentrations NAA (0.00, 0.25 and 0.50 mg L⁻¹) and TDZ (0.00; 0.50 and 1.00 mg L⁻¹), added to Knudson medium. The explants were root tips with approximately 1.0 cm, derived from plants grown in vitro *C. paludicolum*, which remained for 120 days in culture medium. They were evaluated then survival percentage, number of shoots, shoot height, root number and length of roots. The experimental design was completely randomized in a 3x3 factorial arrangement with four replications per treatment. There was a significant interaction between the different concentrations of NAA and TDZ, and there is the need for the presence of exogenous auxin or cytokinin for good survival percentages. For the number of shoots the presence of ANA was crucial, unlike that observed when using isolated TDZ, however, the mean was observed when combined with 0.25 mg L⁻¹ NAA with 0.50 mg L⁻¹ TDZ. For the length of the shoot was actually observed, and the greatest height (42.50 mm) was obtained with treatment 0.25 mg L⁻¹ NAA and 0.50 mg L⁻¹ TDZ. For the number of root concentration of 0.25 mg L⁻¹ NAA when associated with TDZ showed the greatest ability to induce differentiation in roots, in which there was the highest average (7.25) when combined with 0.50 mg L⁻¹ TDZ, though not significantly different when associated with 1.00 mg L⁻¹ TDZ. For the length of the longest root, observers that unlike the other variables, the presence of TDZ was a determining factor in root growth, however the greater length (32.50 mm) was observed in the interaction of 0.25 mg L⁻¹ ANA with 0.50 mg L⁻¹ TDZ. Finally, it was concluded that the presence of NAA and TDZ are fundamental in micropropagation of root tips of *C. paludicolum*, good results can be obtained at a concentration of 0.25 mg L⁻¹ NAA and 0.50 mg L⁻¹ TDZ.

KEY WORDS: Orchidaceae, Thidiazuron, Naphthalene Acetic Acid-1.

1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 39 espécies de *Cyrtopodium* distribuídas no Brasil (BARROS et al., 2013). O nome genérico *Cyrtopodium* R. Br. é oriundo da expressão “pezinho curvo”, devido às características no centro da flor que se assemelham ao dito (GUO et al., 2010). *Cyrtopodium paludicolum* é uma espécie terrícola, geralmente, encontrada em solos permanentemente úmidos, com pseudobulbos grossos e alongados, provavelmente atribuídos ao porte da

espécie (BARROS et al., 2013). Sua propagação natural ocorre principalmente por meio da germinação das sementes, no entanto, sabe-se que a propagação da espécie em ambiente nativo enfrenta dificuldades devido ao extrativismo e a expansão agrícola.

Não há relatos de investigações sobre os meios de cultura para o crescimento de plântulas de *C. paludicolum*, e também não há relatos sobre processos micropropagativos ou regeneração *in vitro* da espécie. Uma variedade de explantes tem sido testada visando a propagação clonal de orquídeas, como ápices radiculares e caulinares, ápices de botões florais, gemas e ápices foliares (COLLI e KERBAUY, 1993; CHEN e CHANG, 2006; MARTIN e MADASSERY, 2006; CHUGH et al, 2009; MULGUND et al., 2011).

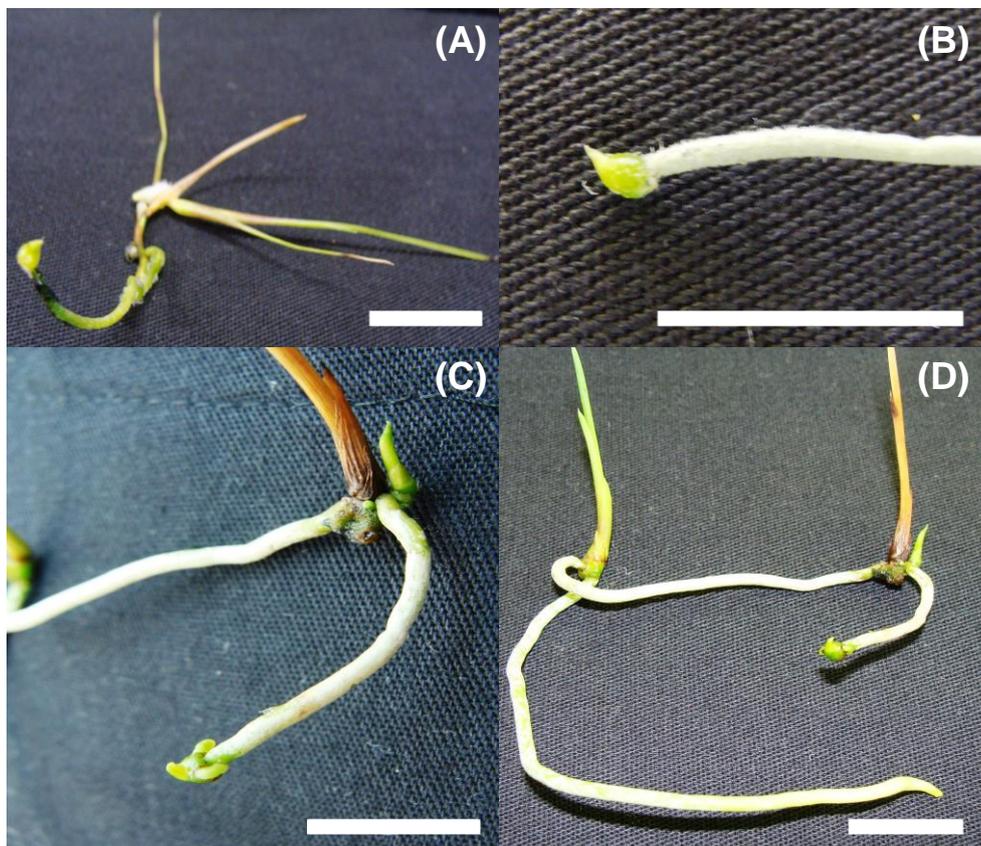
Embora a micropropagação de orquídeas tenha apresentado resultados satisfatórios nos últimos anos, parte dos problemas tem restringido a escolha de explantes, incluindo exsudação fenólica, principalmente quando os explantes têm sido isolados de plantas maduras (CHUGH et al., 2009). Outras dificuldades da técnica estão relacionadas ao número limitado de meristemas, a dificuldade de induzir a formação de corpos semelhantes a protocormos ou "ptotocorms-like body" (PLB) e a variação somaclonal (SANCHEZ, 1988; CHUGH et al, 2009). Embora os ápices radiculares das orquídeas sejam considerados recalcitrantes, a formação de PLBs por células meristemáticas de raízes foram relatados por diversos autores em certas orquídeas, tais como *Vanda* spp., *Oncidium* spp. e *Doritaenopsis* spp. (PARK et al., 2003; WU et al., 2004; LANG e HANG, 2006).

Muitos são os reguladores de crescimentos utilizados em técnicas de micropropagação de orquídeas, assim como suas variadas concentrações, que podem variar de acordo com diversos fatores como o explante e a espécie vegetal. Esta moderna maneira de propagação através da tecnologia de produção fez com que orquídeas, as quais apresentam flores de alto potencial ornamental e comercial, se tornassem mais acessíveis para uma ampla classe da sociedade. Fato este justificado devido ao envolvimento de grandes laboratórios de cultura de tecidos na micropropagação de orquídeas (CHUGH et al., 2009).

Trabalhos realizados com manutenção *in vitro* de plantas de *C. paludicolum* revelaram que os ápices radiculares de órgãos intactos

apresentam a capacidade de conversão em ápices caulinares (Figura 1). No entanto, não houve formação de PLB quando segmentados os ápices da raiz e cultivados no mesmo meio de cultura. Fato semelhante foi observado em vitroplantas de *C. paranense* sob a qual ficou evidente a essencialidade que a planta mãe, durante a formação dos PLBs, exige em permanecer intacta, pois não houve a formação desta estrutura quando as raízes foram segmentadas ou induzidas com reguladores de crescimento (GUO et al., 2010). Assim sendo, objetivou-se verificar a capacidade de ápices radiculares isolados de *C. paludicolum* manterem a competência para conversão em ápice caulinar na presença e ausência de reguladores de crescimento.

Figura 1. Formação de corpos semelhantes à protocormos (PLB) em ápices radiculares de vitroplantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne em meio de cultura Knudson sem a presença de regulador de crescimento. PLB formado a partir da ponta da raiz de mudas cultivadas de forma asséptica (A); PLB em desenvolvimento (B); PLB desenvolvendo raízes durante a conexão com a planta materna (C); vitroplanta desenvolvida a partir da raiz da planta mãe e PLB desenvolvendo-se no ápice radicular (D). Barras = 1 cm. Chapadão do Sul - MS, 2013.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) no Campus de Chapadão do Sul.

2.2 Material vegetal

Foram utilizados ápices radiculares de aproximadamente 1,0 cm, obtidos de plantas de *C. paludicolum* com 120 dias, com aproximadamente 3 – 4 cm de altura, obtidas de processo de germinação assimbiótica e cultivadas *in vitro* em meio Knudson (KNUDSON, 1946).

2.3 Tipos e concentrações dos fitohormônios

Foi utilizada a formulação do meio de cultura Knudson (KNUDSON, 1946) suplementado com 20,0 mg L⁻¹ de sacarose e 4,0 mg L⁻¹ de Agar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, em seguida, foi esterilizado a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar os reguladores de crescimento vegetais filtro estéreis foram adicionados ao meio de cultura enquanto não gelificado.

Os tratamentos consistiram da adição em meio de cultura de diferentes combinações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) e Thidiazuron (TDZ), resultante das seguintes concentrações: TDZ (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,25 e 0,50 mg L⁻¹).

Em seguida com auxílio de um bisturi foram obtidos os ápices radiculares pelo seccionamento da extremidade radicular, resultando em segmento terminal de 1,0 cm, os quais foram utilizados como explantes para micropropagação. Estes explantes foram então transferidos para os frascos que continham o meio de cultura e posteriormente vedados com filme plástico PVC (Dispafilm do Brasil Ltda). Os frascos foram acondicionados em sala de crescimento a 27 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas com 28 μmol m⁻² s⁻¹ de

irradiância, provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas (40W, Philips, extra luz do dia).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com quatro repetições para cada tratamento, sendo cada repetição representada por uma média de três explantes em cada frasco. Após 120 dias foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de brotações e porcentagem de sobrevivência.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias das avaliações obtidas nas diferentes concentrações dos fitorreguladores foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se neste trabalho que as concentrações dos hormônios vegetais TDZ e ANA interferiram diretamente na micropropagação das plantas de *C. paludicolum* (Tabela 1), apresentando interação significativa entre os fitorreguladores em todos os parâmetros analisados.

O comportamento de explantes de *C. paludicolum* para as variáveis % de sobrevivência, número de brotações, comprimento da parte aérea, número de raiz e comprimento da maior raiz em função de concentrações de TDZ e ANA estão dispostos na Tabela 2.

Embora tenha ocorrido a interação na aplicação de ANA e TDZ, observa-se que a porcentagem de sobrevivência de explantes atingiu maiores valores na concentração de 0,0 mg L⁻¹ de TDZ quando se utilizou 0,25 ou 0,50 mg L⁻¹ de ANA, ou então, na ausência de ANA obteve-se a maior taxa de sobrevivência com 1,0 mg L⁻¹ de TDZ. Estes dados ressaltam a importância da utilização das citocininas assim como as auxinas em técnicas de micropropagação de orquídeas (SMITH e MURASHIGE, 1970; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), assim também, Valles e Boxus (1987) ressaltaram a capacidade das auxinas em reduzir a porcentagem de explantes necrosados.

Tabela 1. Quadrado médio (QM) do comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de brotações (NB.) e porcentagem de sobrevivência (%S) das vitroplantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne cultivadas em diferentes combinações de fitohormônios. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.

Fonte de Variação	GL	QM				
		CPA	NR	CMR	NB	%S
TDZ	2	3,4444**	13,3611**	11,8611**	884,3611**	1139,5278
ANA	2	16,8611**	67,0278**	7,4444**	3345,0278**	2264,5278*
TDZ*ANA	4	3,1111**	6,9028 *	3,6111**	572,2778**	5940,4861**
Resíduo	27	0,4259	2,2778	0,9444	24,8796	759,0926
Total	35					

* Significativa a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

Para o número de brotações a melhor condição de meio foi obtida com 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ de TDZ, resultando em 55,25 unidades, que diferiu estatisticamente dos demais (Figura 2 e Tabela 2). Dados opostos aos obtidos para *C. paludicolum* foram observados em plantas de *Xenikophyton smeeanum*, na qual, as menores concentrações de TDZ utilizadas (0,009; 0,05; 0,10 mg L⁻¹) não induziram a formação de brotos. Porém, as concentrações intermediárias de TDZ (1,0; 2,5; 3,0 mg L⁻¹) resultaram nas melhores respostas para formação de brotos (MULGUND et al., 2011). A ausência de resposta mais contundente para brotações em *C. paludicolum* relativo à adição isolada de citocinina exógena relevou que este não é fator determinante na indução do explante a diferenciação em brotações.

Estes dados ressaltam a ideia de que há um efeito sinérgico entre auxina e citocinina quanto aos parâmetros avaliados. Guo et al., (2010) verificaram em *C. paranaense* que a utilização de auxina ou citocinina de forma independente promoveu pouca ou quase nenhuma regeneração do explante para novas brotações, porém quando utilizado de forma concomitante, os hormônios vegetais promoveram maior número de brotos. Adicionalmente, Flashland et al (2011) observaram que para ápices radiculares de *Cyrtopodium brandonianum* a citocinina TDZ ofereceu as melhores respostas para regeneração quando comparada com outras formas de citocininas.

Observaram ainda para essa espécie a adição apenas de citocinina foi suficiente para que 43% dos explantes diferenciassem em multibrotações. Portanto, a associação das citocininas com auxinas regula a morfogênese dos tecidos em cultura, podendo promover diferenciações celulares para obtenção de brotações (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Tabela 2. Resposta de diferentes tratamentos de Thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotações (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e porcentagem de sobrevivência (%S), em função do aumento das concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) ao meio de cultivo, para micropropagação de plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.

Parâmetros	ANA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)		
		0,00	0,50	1,00
%S	0,00	8,25 Bb	75,25 Aa	91,75 Aa
	0,25	91,75 Aa	66,75 Aab	83,50 Aa
	0,50	91,75 Aa	25,00 Bb	50,00 ABa
NB	0,00	0,50 Ab	4,75 Ab	1,25 Ab
	0,25	33,50 Ba	55,25 Aa	16,75 Ca
	0,50	26,75 Aa	11,50 Bb	4,50 Bb
CPA (mm)	0,00	2,50 Ab	12,50 Ab	2,50 Ab
	0,25	17,50 Ba	42,50 Aa	22,50 Ba
	0,50	15,00 Aa	5,00 Ab	5,00 Ab
NR	0,00	0,25 Aa	1,50 Ab	1,50 Ab
	0,25	2,25 Ba	7,25 Aa	4,75 ABa
	0,50	0,25 Aa	0,25 Ab	0,50 Ab
CMR (mm)	0,00	2,50 Ba	27,50 Aa	30,00 Aa
	0,25	2,50 Ba	32,50 Aa	15,00 Bab
	0,50	2,50 Aa	2,50 Ab	10,00 Ab

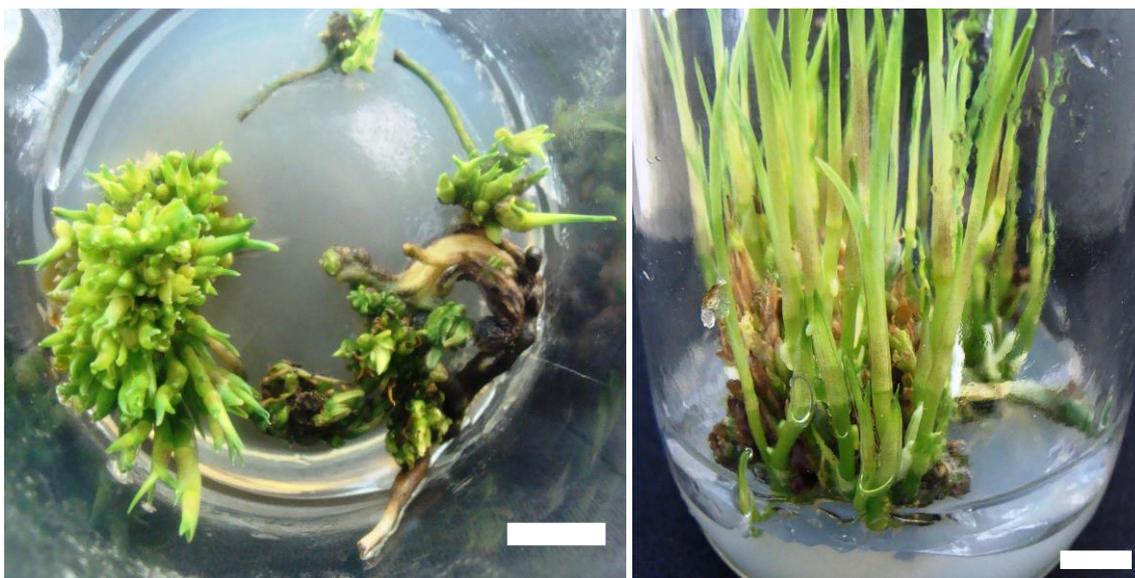
Para cada parâmetro de avaliação médias seguidas da mesma minúscula letra na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Da mesma forma que foi observado para número de brotações, a concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA promoveu maior comprimento da parte aérea, maior número de raízes e maior comprimento de raiz. Para comprimento da maior raiz, também foi obtido resultado favorável na ausência de ANA, quando se aplicou concentrações de 0,50 ou 1,00 mg L⁻¹ de TDZ Segundo Skoog e Miller (1957), a razão auxina:citocinina regula a morfogênese de

tecidos em cultura, enquanto que alta razão auxina:citocinina no meio de cultura estimula a formação de raízes, uma baixa razão leva à formação de parte aéreas, já em níveis intermediários, o tecido cresce como calo indiferenciado.

A auxina, promotora do alongamento celular vegetal, é sintetizada no ápice caulinar e transportada basipetalmente aos tecidos adjacentes, com frequência, quando a fonte endógena de auxina é removida por extirpação, o vegetal tende a responder de forma decisiva a auxina exógena, aumentando rapidamente sua taxa de crescimento aos níveis observados na planta intacta (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Figura 2. Micropropagação de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne a partir de ápices radiculares em meio de cultura Knudson na presença de 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,50 mg L⁻¹ TDZ. Barras = 1 cm. Chapadão do Sul - MS, 2013.



O ácido indol-3-butírico (AIB), definido como auxina natural, foi favorável para a indução de número de raízes até a concentração máxima de 2,00 mg L⁻¹ em plântulas de *Cyrtopodium Sainttlegerianum* assim como ANA até concentrações de 4 mg L⁻¹ (SILVA et al., 2013). Assim como foi observado em *C. paludicolum*, as auxinas têm sido relacionadas ao desenvolvimento de raízes e vários outros processos de desenvolvimento vegetal, como desenvolvimento do tecido meristemático (SU et al., 2011), o desenvolvimento inicial de brotos (MULLER e LEYSER, 2011), e o controle do metabolismo vegetal (PERNISOVÁ et al., 2011).

Os dados obtidos neste trabalho ressaltam o beneficiamento na utilização da interação entre os hormônios vegetais para o desenvolvimento de vitroplantas de *C. paludicolum* e corroboram com a conclusão de Werner et al. (2001) que ressaltaram a superexpressão de citocininas em alguns vegetais gerando o aumento do crescimento da raiz primordialmente pelo aumento no tamanho do meristema apical radicular. Assim, auxinas e citocininas são os principais hormônios vegetais envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento, principalmente nos processos que determinam a arquitetura das raízes (BIELACH et al., 2012).

Por fim, ficou evidenciado que provavelmente os níveis endógenos de auxina não são suficientes para a determinação de competência regenerativa do explante, sendo necessário o fornecimento de auxina exógena após a segmentação da porção distal da raiz do restante da planta, uma vez que o fornecimento de auxina endógena cessou. Portanto, a adição de auxina exógena no meio de cultivo resultou na obtenção de brotações em maior número e frequência em relação ao verificado inicialmente nas raízes intactas (Figura 2).

4. CONCLUSÕES

A interação entre thidiazuron e ácido naftaleno acético interfere na micropropagação de *Cyrtopodium paludicolum* a partir de ápices radiculares.

A combinação de 0,25 mg L⁻¹ de ANA com 0,50 mg L⁻¹ de TDZ mostrou-se a concentração recomendada para multiplicação *in vitro* de *Cyrtopodium paludicolum* a partir de ápices radiculares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. 2013. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11443>. Acesso em 20 de ago. 2013.

BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Biological Sciences**, v.367, n.1595, p.1469-78, 2012.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. **Plant Biology**, v.50, p.169-173, 2006.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

COLLI, S., KERBAUY, G. B. Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocormlike bodies - Effects of auxin and cytokinin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.33, p.39-44, 1993.

FLACHSLAND, E.; TERADA, G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MEDINA, R.; SCHININI, A.; REY, H.; MROGINSKI, L. Plant regeneration from root-tip culture of *Cyrtopodium brandonianum* barb. rodr. (Orchidaceae). **Propagation of Ornamental Plants**, v.11, n.4, p.184-188, 2011:

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 1998. p.183-260.

GUO, W. L.; CHANG, Y. C. A.; KAO, C. Y. Protocorm-like Bodies Initiation from Root Tips of *Cyrtopodium paranaense* (Orchidaceae). **Hortscience**, Taiwan, v.45, n.9, p. 1365–1368, 2010.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.14, p.214-217, 1946.

LANG, N. T.; HANG, N. T. Using biotechnological approaches for *Vanda* orchid improvement. **Omonrice**, v.14, p.140–143, 2006.

MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. P. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants and protocorm like bodies. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.95-99, 2006.

MULGUND, G. S.; NATARAJA, K.; MALABADI, R. B.; KUMAR, S. V. TDZ induced *in vitro* propagation of an epiphytic orchid *Xenikophyton smeeanum* (Reichb. f.). **Research in Plant Biology**, India, v.1, n.4, p.07-15, 2011.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, v.107, p.1203–1212, 2011.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v.164, p.919–923, 2003.

SANCHEZ, M. Micropropagation of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) through root-tip culture. **Lindleyana**, Florida, v.3, p.93–96, 1988.

SILVA, D. M.; CARNEIRO, L. L.; MENDES, D. J.; SIBOV, S. T. Efeito das auxinas ácido naftaleno acético e ácido indol butírico no desenvolvimento in vitro de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. F. (Orchidaceae). **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.9, n.16; p.852-860, 2013.

SU, Y. H.; LIU, Y. B.; ZHANG, X. S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, p.616–625, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

VALLES, M.; BOXUS, P. Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. **Acta Horticulturae**, v.10, p.337-344, 1987.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.98, n.18, p.10487–10492, 2001.

WU, I. F.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effect of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.107–109, 2004.

CAPÍTULO 4 – ACLIMATIZAÇÃO DE *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

RESUMO

A técnica de sementeira *in vitro* de orquídeas apresenta alta taxa de germinação das sementes, porém, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização. A aclimatização é definida como a adaptação climática de um organismo, sendo que neste período a planta fica exposta a várias adversidades. Assim, objetivou-se avaliar a eficiência de diferentes substratos e maneiras de exposição hídrica, durante a fase de aclimatização da orquídea *Cyrtopodium paludicolum* Hoene. Foram utilizadas plantas oriundas do cultivo *in vitro*, nas quais foram testados os seguintes substratos: 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®; 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®; 100% terra vegetal Vitaplan®; 100% argila, os quais foram submetidos a presença ou ausência de lâmina de água na base dos vasos e irrigação por aspersão. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com duas maneiras de exposição hídrica e quatro substratos, com 15 repetições. Verificou-se que a lâmina de água demonstrou-se favorável em todas as variáveis exceto quando utilizado o substrato 100% argila, no entanto na ausência da lâmina de água o substrato 100% terra vegetal demonstrou-se inadequado para o cultivo de mudas de *C. paludicolum*. Por fim, concluiu-se que os substratos Plantmax® ou Plantmax® + casca de Pinus são os mais indicados; a presença da lâmina de água favoreceu o desenvolvimento das mudas, exceto no substrato com 100% de argila; o substrato com 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical® foi o que se demonstrou melhor no desenvolvimento vegetal de *C. paludicolum*, além de proporcionar as maiores médias de sobrevivência das mudas.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, Argila, Lâmina de água.

CHAPTER 4 – ACCLIMATIZATION OF *Cyrtopodium paludicolum* (HOEHNE).

ABSTRACT

The technique of germination *in vitro* to orchid has high rate of the seeds germinated, however, this process has the disadvantage of requiring a period of acclimatization. Acclimatization is defined as the climate adaptation of an organism, and in this period the plant is exposed to various adversities. Thus, we aimed to evaluate the efficiency of different substrates and ways to water exposure during the phase of acclimatization to orchid *Cyrtopodium paludicolum* Hoene. Plants derived from *in vitro* culture, in which the following substrates were tested were used: 50% clay + 50% organic fertilizer Natropical®, 100% Vitaplan® topsoil, 50% clay + 50% Vitaplan® topsoil and 100% clay, which underwent the presence or absence of water depth on the

basis of vessels and sprinkler irrigation. The experimental design was completely randomized factorial with two ways to water exposure and four substrates, with 15 repetitions. It was found that the water slide show favorable in all variables except when used the substrate 100% clay, however in the absence of water depth the substrate 100% topsoil showed to be inadequate for growing seedlings of *C. paludicum*. Finally, it was concluded that the acclimatization on substrates Plantmax® or Plantmax® + pine bark are the most suitable, the presence of the water depth favored the development of seedlings, except with the substrate 100% clay, the substrate with 50% clay + 50% organic fertilizer Natropical® was demonstrated to be best in plant development *C. paludicum*, besides providing the highest mean seedling survival.

KEY WORDS: Orchidaceae, Clay, Water slide.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae contém aproximadamente 2.500 espécies no Brasil, sendo a esta atribuída o crédito de família mais evoluída e a maior em número de espécies do reino vegetal. O gênero *Cyrtopodium* R. Br. compreende 39 espécies aceitas no Brasil, entre as quais vale ressaltar a *C. paludicum* Hoehne que é uma espécie terrícola, de áreas brejosas, podendo ser encontrada principalmente no Cerrado brasileiro (BARROS et al., 2013).

A maioria das plantas, incluindo as orquídeas, pode ser reproduzida por duas vias: por meio da reprodução sexuada, decorrente da polinização de uma flor e da recombinação do material genético ou da forma assexuada pela multiplicação vegetativa (COLOMBO et al., 2005). A multiplicação das orquídeas por sementes é demorada e apenas 5% das 2,5 milhões de sementes produzidas em uma cápsula germinam. Assim, a técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação em até 100%, tornando o processo de multiplicação de orquídeas comercialmente viável (STANCATO e FARIA, 1996). No entanto, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização.

A aclimatização é definida como a adaptação climática de um organismo, especialmente um vegetal, que é transferido para um novo ambiente, sendo todo esse processo realizado artificialmente (TOMBOLATO e

COSTA, 1998), ou seja, esta técnica constitui na retirada das plantas da condição *in vitro*, transferindo-as para a condição *ex vitro* (casa de vegetação), controlando os fatores que possam limitar o seu desenvolvimento, como luminosidade, temperatura, substrato, umidade e nutrientes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; COSTA, 1998). Entretanto, plantas cultivadas *in vitro* normalmente apresentam características morfofisiológicas diferentes daquelas que cresceram diretamente no campo ou em casa de vegetação, sendo este fator responsável pela baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* (PREECE e SUTTER, 1991). Portanto, esta fase é muito suscetível, não apenas pelo estresse da planta aclimatada, mas também, pelo risco de infecções por fungos e bactérias que podem se desenvolver (TOMBOLATO e COSTA, 1998).

O estresse hídrico, geralmente é a maior dificuldade encontrada no processo de aclimatização, podendo uma planta que parece perfeita *in vitro* apresentar deficiências anatômicas que podem comprometer a transpiração, fazendo com que a mesma perca água rapidamente (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Neste período também ocorre a mudança de uma condição praticamente heterótrofa, onde o meio de cultura oferece todo suprimento externo necessário, para uma condição autotrófica, precisando realizar a fotossíntese de forma mais eficiente para sobreviver (GEORGE, 1993). Assim, a planta necessita rapidamente incrementar a absorção de sais, além do fato de passar de um ambiente asséptico para um susceptível ao ataque de microrganismos patogênicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Neste contexto, o substrato é a base de uma boa cultura de orquídea, além de ser o suporte para as plantas, apresenta a incumbência de oferecer qualidades básicas e indispensáveis, como: consistência para suporte, boa aeração das raízes, capacidade de retenção de água, pH adequado, entre outras (SILVA e SILVA, 1997; SILVA, 2000; SOUZA, 2003). Além disso, deve apresentar um meio com alta estabilidade de estrutura, a fim de evitar a compactação, alto teor de fibras resistentes à decomposição, e estar livre de agentes causadores de doenças, de pragas e propágulos de ervas daninhas (KAMPF, 2000).

Além dos substratos de origem vegetal, tais como esfagno, fibra de coco, casca de pinus, xaxim e piaçava, há os de origem mineral, como pedra brita, argila expandida rígida, vermiculita, carvão vegetal, tijolo e os sintéticos,

como isopor (poliestireno expansível) e espuma fenólica, os quais são utilizados principalmente como suporte para as plantas (DEMATTE e DEMATTÊ, 1996; KAMPF, 2000). Portanto, a diversidade de substratos é abundante, mas seu êxito depende da espécie e do tipo de ambiente onde se pretende cultivá-la. Em estufas, onde a umidade e a temperatura são controladas, o substrato não influencia tanto o desenvolvimento vegetativo quanto em ripados ou telados, os quais não se têm o controle desses fatores, assim o crescimento da planta depende do tipo de substrato utilizado (COOKE, 1999; RODRIGUES, 2001),

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes substratos e maneiras de exposição hídrica, durante a fase de aclimatização da orquídea *Cyrtopodium paludicolum* Hoene.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e na Casa de Vegetação da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, em Chapadão do Sul - MS. As plantas foram obtidas por semeadura *in vitro*, a partir de cápsulas, obtidas de plantas adultas de *C. paludicolum*.

2.2 Material vegetal

As mudas com 4 meses após a semeadura, apresentavam a altura média da parte aérea com $3,0 \pm 0,5$ cm e um bom desenvolvimento radicular, quando foram transplantadas.

2.3 Condições de aclimatização

A fim de eliminar o meio de cultura aderido às raízes, as mudas foram lavadas em água corrente e posteriormente transplantadas em vasos plásticos com 10,2 cm de diâmetro, 7,8 cm de altura, volume de $0,415 \text{ dm}^3$ e com 5 furos no fundo, sendo transplantado 1 muda por vaso. Os quatro substratos

avaliados foram: 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®, 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®, 100% terra vegetal Vitaplan® e 100% argila. Para medida das proporções utilizou-se da balança analítica Mark 500®.

Os vasos após o transplântio foram acondicionados em duas maneiras de exposição hídrica: na presença de lâmina de água ou na ausência. A lâmina de água presente em metade dos tratamentos estava relacionada a uma bandeja de 40,0 cm de largura por 60,0 de comprimento e com aproximadamente 7,2 dm³ de água constantemente, formando assim uma lâmina de água e dentro de cada bandeja eram armazenados 10 vasos.

Após o transplântio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação com 70% sombreamento, sendo os substratos irrigados por aspersão três vezes por dia e recebendo aplicações quinzenais do adubo foliar NPK (10:10:10) na concentração de 5,0 g L⁻¹.

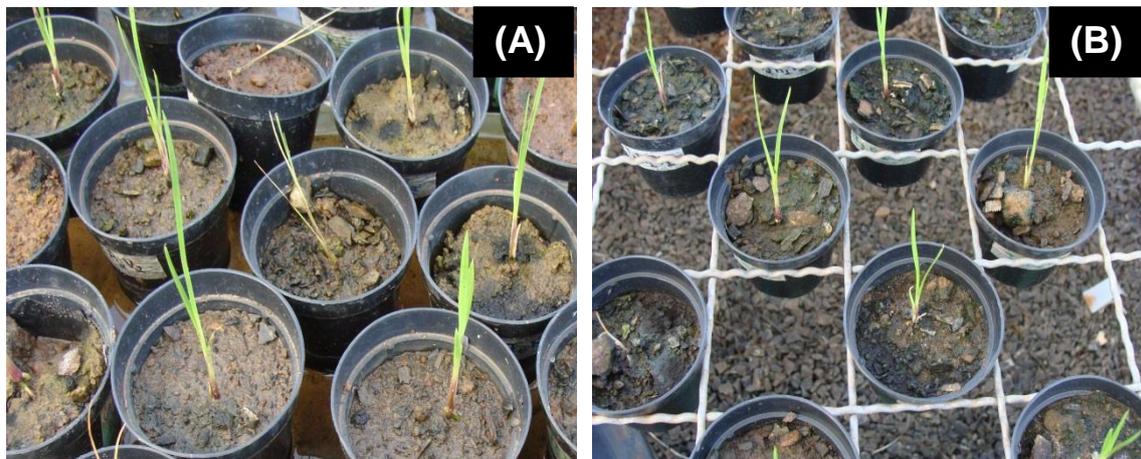
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2, com duas maneiras de exposição hídrica e quatro substratos, cada tratamento composto por 15 repetições e cada repetição representado por um vaso com uma planta. Após 90 dias foram avaliados taxa de sobrevivência, número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz e número de brotações. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de lâmina de água favoreceu a sobrevivência de *C. paludicolum* em todos os substratos, entretanto, apenas no substrato 100% terra vegetal Vitaplan® houve diferença estatística para a ausência de lâmina de água, mas mesmo na presença de lâmina de água nesse substrato, a sobrevivência foi de apenas 53,33% das mudas (Figura 1 e Tabela 1).

Em relação aos substratos, as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas com 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan® e com 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®, independente da lâmina de água.

Figura 1. Aclimatização de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne na presença de lâmina de água (A) ou na ausência (B). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.



Um fator chave para a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização é a manutenção da alta umidade do substrato (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

A presença de substratos que garantam o equilíbrio entre desenvolvimento do sistema radicular, que é fundamental para a manutenção da planta como um todo, juntamente com a parte aérea que é essencial em plantas ornamentais, determinou interesse neste experimento. Assim, para variável número de raiz, quando na presença da lâmina de água, não houve diferenças estatísticas entre os substratos, porém quando na ausência da lâmina de água o substrato com 100% terra vegetal Vitaplan® resultou em 100% de mortalidade das plantas, demonstrando-se inadequado para o cultivo da espécie (Tabela 1).

Entre as maneiras de exposição hídrica, não houve diferença estatística entre os substratos, exceto para o substrato com 100% terra vegetal Vitaplan® que apresentou melhoria no desenvolvimento vegetal quando exposto a lâmina de água permanente, formando em média 4,13 raízes por planta. Durante a fase de aclimatização, a formação de raízes funcionais é considerada o fator primordial em relação ao desenvolvimento da parte aérea, uma vez que são as raízes que garantirão a nutrição e, conseqüentemente, a sobrevivência das plantas (COLOMBO et al., 2005).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência referente a diferentes substratos quando na ausência ou presença de lâmina de água na fase de aclimatização de plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.

Lâmina de água	Substratos			
	50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®	50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®	100% terra vegetal Vitaplan®	100% argila
Presença	100,00 Aa	100,00 Aa	53,33 Ba	73,33 ABa
Ausência	86,67 ABa	93,33 Aa	0,00 Cb	60,00 Ba

Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Para o comprimento das raízes observou-se na presença da lâmina de água, o substrato 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical® apresentou maior média (61,13mm) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. O húmus de minhoca presente no adubo orgânico é, em média, 70% mais rico em nutrientes que os húmus convencionais, além de ser rico em microrganismos, com pH neutro proporciona alta retenção de água (LONGO, 1987; AQUINO et al., 1992).

Já na ausência da lâmina de água, apenas o substrato com 100% terra vegetal Vitaplan® diferiu dos demais tratamentos, por não apresentar desenvolvimento das mudas (Tabela 2). A exposição da lâmina de água para as mudas de *C. paludicolum* proporcionou efeito benéfico nos substratos com 100% terra vegetal Vitaplan® e 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®, apresentando crescimento radicular de 38,93 mm e 61,13 mm respectivamente, porém, quando utilizado 100% de argila como substrato a irrigação por aspersão apresentou 41,27 mm enquanto que na lâmina de água o crescimento foi de 24,40 mm.

A presença da lâmina de água proporcionou diferença estatística quanto ao número de folhas, observou-se maior média (4,47) quando as mudas foram transplantadas no substrato com 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®,

porém não diferiu estatisticamente do substrato com 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical® e com o substrato de 100% terra vegetal Vitaplan®. Quando observado os substratos expostos apenas a irrigação observou-se que apenas o substrato 100% terra vegetal Vitaplan® diferiu dos demais por não apresentar desenvolvimento nas mudas (Tabela 2).

Solos argilosos com textura mais fina retêm água em maior quantidade que os solos de textura arenosa, devido à maior área superficial e a poros menores entre partículas (TAIZ e ZEIGER, 1991). Assim, a retenção de água obtida nos substratos com altos percentuais de argila proporcionaram melhor desenvolvimento, provavelmente, por se assemelharem as características dos locais onde as plantas de *C. paludicolum* são nativas, ou seja, em áreas brejosas.

Quando observados os diferentes meios de exposição hídrica, para variável número de folhas, verificou-se que a lâmina de água interferiu positivamente nos tratamentos com substratos de 100% terra vegetal Vitaplan® e com 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®, apresentando a média de 4,47 e 3,93 folhas respectivamente.

Para variável comprimento da parte aérea a maior média observada foi de 111,53 mm, quando as mudas foram aclimatadas em lâmina de água no substrato com 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®, porém este diferiu estatisticamente apenas do substrato com 100% de argila (Tabela 2). Quando as mudas foram submetidas apenas ao sistema de irrigação verificou-se que o substrato com 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical® apresentou maior média (115,40 mm), no entanto, não diferiu do tratamento com 100% de argila. Segundo Assis (2003), o pseudobulbo exerce um importante papel na demanda energética da planta, uma vez que armazena água e carboidratos.

Quanto a exposição hídrica a lâmina de água foi favorável para o crescimento caulinar nos tratamentos com 100% terra vegetal Vitaplan® e 50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®, portanto não apresentou o mesmo efeito quando o substrato era 100% argila, no qual a irrigação por aspersão apresentou média de 98,67 mm diferindo estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) referentes a plantas de *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne aclimatizadas em diferentes substratos – EH - (Presença de lâmina de água – PLA; Ausência de lâmina de água – ALA). CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2013.

Parâmetros	EH	Substratos			
		50% argila + 50% de terra vegetal Vitaplan®	50% argila + 50% adubo orgânico Natropical®	100% terra vegetal Vitaplan®	100% argila
NR	PLA	4,40 Aa	4,20 Aa	4,13 Aa	3,80 Aa
	ALA	4,93 Aa	4,60 Aa	0,00 Bb	3,93 Aa
CMR (mm)	PLA	46,80 Ba	61,13 Aa	38,93 Ba	24,40 Cb
	ALA	37,13 Aa	43,40 Ab	0,00 Bb	41,27 Aa
NF	PLA	4,47 Aa	3,93 ABa	3,93 ABa	3,33 Ba
	ALA	3,47 Ab	3,80 Aa	0,00 Bb	3,27 Aa
CPA (mm)	PLA	111,53 Aa	99,47 Aa	90,00 ABa	67,73 Bb
	ALA	80,53 Bb	115,40 Aa	0,00 Cb	98,67 ABa

Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A possível explicação para o efeito negativo no alongamento da parte aérea assim como o alongamento do sistema radicular no substrato com 100% de argila quando em lâmina de água, provavelmente pode estar relacionado a saturação hídrica do substrato, assim impedindo a penetração de gases no solo, conseqüentemente sem aeração a planta apresentou resultados que demonstram-se como prejudiciais no seu desenvolvimento.

4. CONCLUSÕES

A presença da lâmina de água favoreceu o desenvolvimento das mudas, exceto no substrato com 100% de argila.

O substrato com 50% argila + 50% adubo orgânico Natropical® foi o que demonstrou resultados mais favoráveis no desenvolvimento vegetal de *C. paludicum* durante o período de aclimatização, independente da maneira de exposição hídrica, além de proporcionar as maiores médias de sobrevivência das mudas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; SILVA, V. F. **Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem**. Comunicado Técnico, 8. Rio de Janeiro: Embrapa/CNPBS. 1992. 12p.

ASSIS, A. M.; COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B. Longevidade pós-colheita de pseudobulbos com flores de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.9, n.1, p.85-87, 2003.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. 2013. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11443>. Acesso em 20 de ago. 2013.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.1, p.145-150, 2005.

COOKE, R. B. Estufas e telados. **Revista Oficial da Orquidário**, Rio de Janeiro, v.13, n.3 e 4, p.94-101, 1999.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Ed.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

DEMATTE, J. B. I.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.11, p.803-813, 1996.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. 1574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa, 1990. p.99-170.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2000. 254p.

LONGO, A. D. **Minhoca: de fertilizadora do solo a fonte alimentar**. São Paulo: Ícone, 1987.79p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

RODRIGUES, V. T. Substratos e cultivo. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, Rio de Janeiro, n.44, p.50-54, 2001.

SILVA, F. S. C. Haverá algum substrato que substitua o xaxim?. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, Rio de Janeiro, n. 44, p. 68-76, 2000.

SILVA, F. S. C.; SILVA, S. P. C. O substrato na cultura das orquídeas, sua importância, seu envelhecimento. **Revista Oficial da Orquidário**, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p.3-10, 1997.

SOUZA, M. **Muito além do xaxim**. Natureza, São Paulo, n.2, p.32-37, 2003.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: effects of macro and microelements. **Lindleyana**, West Palm Beach, v.11, n.1, p.41-43,1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Benjamin, 1991. 559p.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo (Boletim técnico, 174). 1998. 72p.