

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

DESIRÉE KRISLEYNE CANDIDO MODESTO

MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Catasetum rooseveltianum* HOEHNE.

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

DESIRÉE KRISLEYNE CANDIDO MODESTO

MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Catasetum rooseveltianum* HOEHNE.

Orientador: Prof. Dr. Cid Naudi Silva Campos

Co- 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
2017



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: DESIRÉE KRISLEYNE CANDIDO MODESTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cid Naudi Silva Campos

TÍTULO: CULTIVO *IN VITRO* DE *Catasetum rooseveltianum* HOEHNE.

Prof. Dr. Presidente Cid Naudi Silva Campos

Prof. Dr. Cassiano Garcia Roque

Prof. Dr. Paulo Eduardo Teodoro

Chapadão do Sul, 12 dezembro de 2017.

A DEUS,

Por ter me dado discernimento,
sabedoria e paciência para concluir este
trabalho.

Aos meus pais,

Vilmar Modesto da Silva e Marlene
Cristina Candido Modesto, pelo apoio as
minhas decisões.

Ao Professor Doutor,

Vespasiano Borges de Paiva Neto,
pela oportunidade de realizar este sonho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nesta trajetória da minha vida, e colocar pessoas no meu caminho me inspiram, me ajudaram, me desafiaram e me encorajaram a ser cada dia melhor.

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

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Cid Naudi Silva Campos, no qual me ajudou na finalização desta dissertação.

Ao meu Co- orientador Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto, pelos conselhos, por todas as vezes que eu chorei, acreditando que cada lágrima seria um avanço pessoal, por ter me incentivado nas horas mais difíceis, pela paciência e ter acreditado em mim.

As técnicas de laboratório Daly Roxana Castro Padilha e Priscila Liber pelo apoio técnico, pela ajuda e amizade.

Aos meus colegas de laboratório Manuela e Carlos, pela amizade, por me ajudarem e participarem deste momento.

As Professoras Dr^a. Charline Zaratín Alves e Dr^a. Matildes Blanco, pelos conselhos nos momentos mais difíceis e pela amizade.

A minha família, pelo apoio em mim depositados em todos os momentos.

" *A persistência é o menor caminho do êxito* "

Charles Chaplin.

RESUMO

MODESTO, Desirée K Candido. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cultivo *in vitro* de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne. Professor Orientador: Drº. Cid Naudi Silva Campos.

O cultivo *in vitro* de orquídeas é utilizada para a conservação de espécies e produção de plantas comercialmente importantes, porém há exigências específicas para atender às necessidades de cada espécie. O objetivo do trabalho foi determinar um protocolo para obtenção de mudas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne pelo uso das técnicas de cultivo *in vitro*. Foram utilizados fragmentos radiculares e dois fitorreguladores: ácido 1-naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) nas concentrações: ANA (0,00; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) e TDZ (0,00; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹), em meio de cultura Knudson. Os explantes foram seccionados e permaneceram durante 90 dias em meio de cultura. Após, foram avaliados número de brotos, folhas e raízes do maior broto e número de calos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3, com cinco repetições. Quanto ao alongamento dos brotos de *C. rooseveltianum* foram testados em meio de cultura Knudson doses de GA₃ (0,00; 3,00; 6,00; 9,00 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Após 60 dias foram avaliados os parâmetros: comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de raízes e massa fresca de brotos. A variável número de brotos a presença de TDZ foi determinante quando o meio foi acrescido de 0,50 mg L⁻¹ de TDZ isolado sendo recomendada para indução de brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne. Para comprimento da parte aérea, número de raízes, não houve efeito entre as doses de GA₃. Para o comprimento da raiz e massa fresca de brotos as doses de GA₃ foram significativas, sendo que a ausência desse fitorregulador proporcionou o melhor resultado nestas variáveis. Sendo assim uso de GA₃ contribui negativamente para o alongamento de brotações *in vitro* de *C. rooseveltianum* Hoehne, tornando desnecessário a utilização deste fitorregulador na produção de mudas.

PALAVRAS-CHAVE: Fitorreguladores, *In vitro*, Orchidaceae.

ABSTRACT

MODESTO, Desirée K Candido. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Cultivo *in vitro* de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne
Author: Desirée K Candido Modesto.
Adviser: Dr. Cid Naudi Silva Campos.

The *In vitro* cultivation of orchids is used for species conservation and production of commercially important plants, but there are specific requirements to meet the needs of each species. The objective of this work is to determine the protocol for obtaining seedlings of *Catasetum rooseveltianum* Hoehne by the use of *in vitro* cultivation techniques. Root fragments and two phytohormones were used: 1-naphthalene acetic acid (ANA) and thidiazuron (TDZ) at concentrations: ANA (0.00, 0.25 and 0.50 mg L⁻¹) and TDZ (0.00, 0.5 and 1.00 mg L⁻¹) in Knudson culture medium. The explants were sectioned and remained for 90 days in culture medium. After, there were managerial races, leaves and roots of the big bud and number of calli. The experimental design was entirely random in a 3x3 factorial scheme, with five replications. As for the elongation of *C. rooseveltianum* shoots were tested in Knudson culture medium doses of GA₃ (0.00, 3.00, 6.00, 9.00 mg L⁻¹). The experimental design was completely randomized with four treatments and five replicates. After 60 days of aviation, the root radius, root number and fresh mass of shoots. A variable number of shoots was the presence of TDZ to determine when the medium was supplemented with 0.50 mg L⁻¹ of TDZ alone by recommendation for induction of *C. rooseveltianum* Hoehne shoots. Parameter of aerial part, number of roots, there was no effect as doses of GA₃. According to GA₃ doses were significant, and the absence of the phytohormone provided the best result in these variables. Therefore, use of GA₃ contributes negatively to the monitoring of *in vitro* shoots of *C. rooseveltianum* Hoehne, making it unnecessary to use the phytohormone in the production of seedlings.

KEY-WORDS: Phytohormones, *In vitro*, Orchidaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA

PÁGINA

CAPÍTULO 1- MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE) APARTIR DE EXPLANTES RADICULARES.

- 1 Frasco contendo protocormos de *C. rooseveltianum* Hoehne obtidos através da micropropagação *in vitro* com TDZ 0,50 mg L⁻¹ isolado aos 90 dias de cultivo (a); Frasco com ausência de fitorreguladores contendo o maior número de folhas (b); Raízes na parte basal do explante (seta), obtida através ANA 0,25 mg L⁻¹ isolado (c)..... 19

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO ALONGAMENTO DE BROTO DE *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE).

- 1 Comprimento da raiz de brotos de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (GA₃) 28
- 2 Brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne obtidos através da micropropagação *in vitro* com GA₃ aos 60 dias de cultivo. Tratamento um (T1) com a ausência e tratamento dois (T2) com 3,00 mg L⁻¹ de GA₃ 28
- 3 Massa Fresca de brotos de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (GA₃)..... 29

LISTA DE TABELA

TABELA		PÁGINA
CAPÍTULO 1- MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> <i>Catsetum rooseveltianum</i> (HOEHNE) APARTIR DE EXPLANTES RADICULARES.		
1.	Quadrado Médio (QM) do número de brotos, folhas e raízes do maior broto e número de calos presentes em explantes obtidos a partir das porções apical (A), mediana (M) e basal (B) de raízes de vitroplantas de <i>Catsetum rooseveltianum</i> Hoehne com combinações de fitorreguladores. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2017.....	17
2.	Efeito isolado de thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotos (NB) região apical (A), número de folhas (NF) região basal (B) e número de raízes (NR) região apical (A) e mediana (M) do maior broto.....	17
3.	Tratamentos de thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotos (NB), folha (NF) e raiz (NR) do maior broto em função do aumento de concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) ao meio de cultivo Knudson, para a micropropagação de plantas de <i>Catsetum rooseveltianum</i> Hoehne. CPCS/UFMS, Chapadão do Sul – MS, 2017.....	18
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO ALONGAMENTO DE BROTOS DE <i>Catsetum rooseveltianum</i> (HOEHNE).		
1.	Análise de variância referente ao crescimento e desenvolvimento das plantas de <i>Catsetum rooseveltianum</i> Hoehne submetidas com concentrações de GA ₃ . Variáveis analisadas: comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CPR) e massa fresca de brotos (MF).....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 <i>Catasetum rooseveltianum</i> Hoehne	3
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> das orquídeas.....	3
2.2.1 Fitorreguladores	4
2.2.2 Micropropagação.....	6
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO 1- MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> <i>Catasetum rooseveltianum</i> (HOEHNE) APARTIR DE EXPLANTES RADICULARES.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4 CONCLUSÃO.....	20
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO ALONGAMENTO DE BROTOS DE <i>Catasetum rooseveltianum</i> (HOEHNE).	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4 CONCLUSÃO.....	29
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem à família das orquidáceas, conhecida como uma das famílias botânicas mais numerosas (BELLAYER et al., 2015). Possuem maior diversidade em regiões tropicais sendo que o Brasil se destaca por apresentar 12,05% da flora mundial de Orchidaceae, dos quais se desenvolvem em determinadas áreas geográficas (RECH et al., 2011).

Dentre todas as espécies vale ressaltar a *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, é encontrada em regiões do Norte (Rondônia) e Centro-Oeste (Mato Grosso), onde há vegetações do tipo floresta ciliar ou galeria, floresta e campo de várzea, palmeiral e área antrópica (BARROS et al. 2015). Devido a intensa expansão agrícola e extrativismo predatório dessas regiões as orchidaceae vem sofrendo risco de extinção (MELO et al., 2015).

A família das orquidáceas possui um grande potencial econômico e ornamental, tornando onerosa a multiplicação em grandes quantidades para a comercialização. Contudo em seu habitat natural seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo é lento sendo inviável economicamente sua produção.

O cultivo *in vitro* em meio nutritivo, utilizando a técnica de cultura de tecidos, permite acelerar esse processo e elevar a taxa de germinação, tornando o processo de multiplicação *in vitro* de orquídeas viável (FARIA et al., 2006). Esta técnica apresenta vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, como a multiplicação rápida e fitossanitária suprimindo a demanda do mercado e ainda minimizando as coletas predatórias de orquídeas (CHAPLA et al., 2009).

Diante do exposto, espera –se obter uma multiplicação rápida e fitossanitária de mudas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, com o objetivo de determinar um protocolo de micropropagação, permitindo a produção de plantas para o uso de programas de conservação e para exploração comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A família das Orchidaceae é originária da Malásia (GARAY, 1972) e possui em torno de 25.000 espécies e 850 gêneros sendo consideradas umas das maiores famílias, entre as monocotiledôneas. Sua distribuição é cosmopolita, embora seja

mais abundante e diversificada em florestas tropicais, especialmente da Ásia e das Américas (DRESSLER 1993, 2005).

As orquídeas são plantas denominadas perenes e habitam diferentes meios podendo ser terrícolas, rupestres, epífitas ou saprófitas quando desprovidas de clorofila, são rizomatosas ou caulescentes com crescimento simpodial ou monopodial (SOUZA; LORENZI, 2005).

Esta família apresenta os mais complexos e integrantes mecanismo de polinização já conhecidos, sendo suas flores polinizadas por diversos grupos de insetos e aves. O principal polinizador são as abelhas (*Hymenoptera*), responsável por 60% da polinização dessas espécies do qual tem sido indicada como característica basal nas famílias das orchidaceae (VANDER; DODSON 1966; DRESSLER 1981).

Segundo (HOEHNE, 1949), as orquídeas possuem o maior potencial ornamental, devido apresentarem flores de diversos tamanhos e dispostas em grandes inflorescências. Além do aspecto ornamental, alguns gêneros fornecem produtos alimentícios, como a baunilha (espécie do gênero *Vanilla*), medicinais e outros produtos utilizados na indústria.

No Brasil e no mundo o cultivo e o comércio de orquídeas têm sido alicerçados em práticas de extrativismo predatório devido a essas diversas utilidades e sua grande variabilidade genética. Com a constante depredação e destruição de seus habitats, que cada dia se torna mais restrito com o avanço da agricultura e o processo contínuo de urbanização (CAEDOSO; ISRAEL 2005), a CIETES (convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Flora e Fauna Selvagem em Perigo de Extinção) inclui todos os gêneros de orquídeas (ROBERTS; DIXON, 2008) em extinção.

Nos últimos anos o Brasil aumentou a produção de flores atingindo assim uma importância significativa no mercado internacional, sendo que a produção *in vitro* foi essencial para produzir plantas com maior qualidade e valor comercial (MATA-ROSAS et al., 2011). A exportação dessas plantas é regulamentada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis).

2.1 *Catasetum rooseveltianum* Hoehne

Entre as mais variadas espécies de orquídeas destaca-se a *Catasetum rooseveltianum* que pertence ao gênero *Catasetum* da subtribo Epidendroide das quais se desenvolvem em áreas tropicas das Américas do Sul e Central (MORAES et al., 2011). São espécies de maioria epífita do qual crescem na parte superior dos troncos, sendo também uma pequena parte rupícula, crescendo sobre formações rochosas (HOEHNE, 1938).

Segundo (HOEHNEL, 1946), a espécie *C. rooseveltianum* é classifica como uma erva epífita robusta, possui pseudobulbos eretos ou arqueados, delgados de 20 a 30 cm de altura, inflorescência é de forma racemosa, basal, ereta e rija, possuindo de 3 a 8 flores na extremidade terminal, suas flores são dimorfas e apresentam um dos mais impressionantes sistemas de polinização já estudado.

Está espécie não é endêmica do Brasil, sendo encontras em regiões do Norte (Rondônia) e Centro-Oeste (Mato Grosso), onde há vegetações do tipo floresta ciliar ou galeria, floresta e campo de várzea, palmeiral e área antrópica (BARROS et al., 2015). No entanto, um exemplar dessa espécie do tipo epífita foi coletado no município de Costa Rica, no Estado de Mato Grosso do Sul, sobre bacuri (*Scheelea phalerata* (Mart.) Burret), em regiões de cerrado (PAIVA NETO et al., 2015).

2.2 Cultivo *in vitro* das orquídeáceas

As orquídeáceas incluindo a do gênero *Catasetum* apresentam um processo de desenvolvimento muito lento no seu habitat, levando também as espécies desse gênero a uma rápida extinção. Segundo (FARIA et al., 2006), o cultivo *in vitro* se torna uma técnica de multiplicação viável, acelerando o processo de propagação permitindo produzir mudas de qualidade, em grandes quantidades para a comercialização e a inclusão delas em seus habitats naturais.

Esta técnica vem sendo utilizada a mais de 30 anos no Brasil afim de aumentar a produção dessas mudas e em especial reduzir o custo (STANCATO et al., 2001). No país existem cerca de 36 laboratórios particulares de propagação clonal de plantas ornamentais, dos quais apenas onze tem orquídeas como as principais espécies cultivadas. A maior parte dos laboratórios existentes são particulares ou estão conveniados a empresas privadas, com isso vários protocolos de propagação *in vitro* são restritas as tais empresas (TOMBOLATO; COSTA, 1998)

A produção em larga escala de espécies raras e híbridos da família das orchidaceae, utilizando a técnica de cultivo tem contribuído para que as orquídeas estejam entre as dez principais flores de corte do mundo (CHUGH; GUHA; RAO, 2009). Estas técnicas de cultivo são capazes de proporcionar a germinação, e ainda possibilitam o crescimento e o desenvolvimento de orquídeas cultivadas (SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2013).

Segundo (CALDAS et al., 1998), no cultivo *in vitro* o meio deve conter todas as fontes de micro e macro nutrientes, vitaminas, fitorreguladores, além de fontes de carbono e oxigênio para que a planta possa desenvolver como se estivesse em condições naturais.

Atualmente, os meios utilizados são baseados nas modificações empíricas de algumas formulações básicas e nas exigências nutricionais de plantas inteiras (KANASHIMIRO, 2007). Com isso os compostos adicionados aos meios de cultivo suprem as necessidades energéticas, metabólicas e estruturais da célula, uma vez que as mesmas vias bioquímicas básicas que atuam nas plantas permanecem nos tecidos *in vitro* (STANCATO et al., 2008). Entretanto, as proporções consideradas ideais variam exatamente entre os genótipos das plantas e sistema de cultura (WILLIAMS 1993).

2.2.1 Fitorreguladores

Para o desenvolvimento de protocolos de multiplicação *in vitro* de orquídeas, é necessário o conhecimento das funções dos reguladores de crescimento pois ele pode promover, inibir ou modificar os processos fisiológicos dependendo das suas concentrações (KYTE; KLEYN, 2010).

A escolha dos fitorreguladores a serem utilizados na cultura *in vitro* é de extrema importância, pois dependerá do tipo de morfogênese desejada, durante o período da cultura e da possível interação entre os fitorreguladores endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003).

Os fitorreguladores vegetal são classificados em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e inibidores. Os fitorreguladores de crescimento mais utilizados são auxinas, citocininas e giberelinas (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). As auxinas têm sido relacionadas a vários processos de

desenvolvimento vegetal, como o desenvolvimento inicial de brotos e raízes (MULLER; LEYSER, 2011), desenvolvimento do tecido meristemático (SU et al., 2011) e o controle do metabolismo vegetal (PERNISOVÁ et al., 2011), as mais utilizadas no cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido a-naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (CARVALHO, 1999). Segundo (RAHMAN, 2013) as auxinas desempenham papel central e interage com vários hormônios na regulação, crescimento e desenvolvimento das plantas.

As citocininas estimulam a divisão celular e em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; as mais freqüentes, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6- bencilaminopurina (BAP ou BA) e thidiazuron (TDZ) (CARVALHO, 1999).

O TDZ foi originalmente desenvolvido para ser utilizado como desfolhante do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Essa substância tem mostrado efeito semelhante aos das citocininas, quando aplicado em concentrações muito reduzidas (SOUZA et al., 1998).

Em vários casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação às outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. Segundo Malik e Saxena (1992), entre as várias citocininas ou compostos com atividade tipo citocinina testados, o TDZ foi o mais efetivo na indução de formação de brotos em cultura de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.).

As giberelinas induzem o crescimento dos entrenós e dos meristemas ou gemas *in vitro*; podem romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de brotos ou raízes adventícias. Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA₃) é o mais empregado (CARVALHO, 1999).

É conhecido o tratamento com este hormônio no alongamento celular de entrenós em diversas espécies, especialmente em plantas geneticamente anãs ou em rosetas. Associada ao expressivo alongamento do caule ocorre a redução de sua espessura, além de produção de filhas menores e mais clara (TAIZ e ZEIGNER, 2013).

Sendo assim, é necessário cuidado na concentração e na composição de fitorreguladores no meio cultura, pois estes podem ser elementos determinantes para a 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 Micropropagação

Segundo (STANCATO et al., 2001), o Brasil possui todas as condições favoráveis para o desenvolvimento da orquidofilia com fins comerciais, estando em uma posição geográfica privilegiada, que permite o cultivo de orquídeas interessantes à floricultura, no entanto falta tecnologia para o país competir no mercado externo.

A cultura de tecidos *in vitro* permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, sobre um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais (iluminação e temperatura) controladas, baseando – se no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões que originarão uma planta inteira (embriogênese somática) em um meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1996).

No entanto, a regeneração de plantas a partir de ápices radiculares e folhas jovens estão sendo muito utilizadas, pois essas regiões meristemáticas possuem uma alta capacidade de induzir a formação de calos e estruturas semelhantes a protocormos ou protocormóides (originalmente chamados de “ protocorm-like-bidies”) permitindo a produção de larga escala de plantas superiores (CHEN; CHANG 2002; KERBAY, 2004).

Devido a capacidade desses tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos, tem despertado a atenção de pesquisadores em virtude de sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas (KERBAY, 2004).

Diversos reguladores de crescimentos são utilizados em técnicas de micropropagação de orquídeas, assim como variadas concentrações. As auxinas e citocininas são as mais empregadas nas técnicas de micropropagação, mostrando bons resultados na indução para a diferenciação em brotações (HU; WANG, 1983; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entre o grupo das auxinas, o ácido 1-

naftaleno acético (ANA) é o mais recomendado na micropropagação de ápices radiculares (CHUGH; GUHA; RAO, 2009) e dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA₃), além de favorecer o alongamento de parte aérea, possui a capacidade de reduzir a porcentagem de explantes necrosados (VALLES; BOXUS, 1987).

Mesmo com o meio empregado e das condições de desenvolvimento e crescimento, os resultados do cultivo *in vitro* de ápice radiculares sofrem influência do genótipo. Sendo assim, é observado resultados diferentes tanto no cultivo *in vitro* de diferentes espécies, como no de diferentes variedades de uma mesma espécie (CASTRO; ANDRADE, 1995).

3 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.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. Orchidaceae *in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.

BELLAVER, L. A et al. Regeneração *in vitro* de *Cyrtopodium Paranaence* SCHLTR (Orchidaceae) a partir das regiões meristemáticas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Curitiba, PR, v.4, p.100-109, 2015.

CARDOSO, J.C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.169-173, abr-jun 2005.

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: **Embrapa – SPI, Embrapa – CNPH**, 1998. v.1, p.104.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L).** 1996. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Biología Vegetal, Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politecnica de Madrid, Madrid, 1996.

CARVALHO, J.M.F.C. de. Técnicas de micropropagação. **Embrapa Algodão Documentos**, n.64, p.39, 1999.

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. et al. pH, Carvão ativo e agentes geleificantes no meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.5, n.2, p. 87-93, 2009.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis *in Oncidium* Gower Ramsey. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 41-44, 2002.

KERBAUY, G.B. Estágio atual do emprego de técnicas biotecnológicas para pesquisa em plantas orquídeas. In: Barros, F.; Kerbauy, G.B. (Org.) **Orquidologia sul-americana**: uma compilação científica. São Paulo: SMA, p. 51-58, 2004.

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

DRESSLER, R.L. The orchids: natural history and classification. **Harvard University Press**, Cambridge, 1981.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993.

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

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDERIOS, M. J. L. Fatores inerentes à micropropagação. Campina Grande, PB, **Embrapa Algodão. Documentos**, Capina Grande, PB, n. 148, maio. 2006.

FARIA , T. de et al. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Revista Acta Sci. Agron**. Maringá, v. 28, p. 71-74, 2006.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae, II. **J.Arnold Arbor. Harv. Univ.**, v. 53, 1972, p. 203-215.

GRATTAPAGGLIA D.; MACHADO M., Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS; Buso JA. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília, EMBRAPA/CNPq. p.183-260, 1998.

HOEHNE, F. C. **Monografia das Asclepiadaceas brasileiras**. Comissão de linhas telegráficas estratégicas de Matto – Grosso ao Amazonas. São Paulo, 1916

HOEHNE, F.C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1949.

HOEHNE, F.C. As plantas ornamentais da flora brasileira. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v.1, p. 247-273, 1938.

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.

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. Estágio atual do emprego de técnicas biotecnológicas para pesquisa em plantas orquídeas. In: Barros, F.; Kerbauy, G.B. (Org.) **Orquidologia sul-americana: uma compilação científica**. São Paulo: SMA, p. 51-58, 2004.

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

MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*) chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, v.19, n.6, p.731-740, 1992.

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.

MELLO, V. dos *et al.* Determinação do número de cromossomos de *Catasetum denticulatum* F.E.L. MIRANDA (Orchidaceae). **Revista Cáceres**, MT, v. 2, n. 1, 2015.

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

PAIVA NETO, V. B. *et al.* *In vitro* propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and applied Biotechnology**, V.15, p 10-17, 2015.

PEDROSO-DE-MORAES, C. *et al.* Radicular anatomy of twelve representatives of the Catasetinae subtribe (Orchidaceae: *Cymbidieae*), **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 455-467, 2011.

PERNISOVÁ, M., KUDEROVÁ, A.; HEJÁTKO, J. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. **Current Protein & Peptide Science**, Florida, EUA, v. 12, p.137–147, 2011.

RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 147, p. 28–35, 2013.

RECH, A. R *et al.* Levantamento e características ecológicas de orchidaceae da mata ciliar do rio Dourados. **Revista Árvore**, v.35, nº.3, 2011.

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

SANTOS, A. F.; VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; GOULART, M. S.; NOVAIS, R. F.; CECON, P. R.; TEXEIRA, S. L.; MOURA, E. Otimização da propagação de *Sophrontis coccínea* (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 o uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, vol.31, n.1, p.63-67. 2013.

SANTOS, E.K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: Freitas, L.B.; Bered, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: Editora de **UFRGS**, 2003. p.415-444.

SOUZA, C.M. de; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, B.M.; MALUF, W.R.; MORAIS, A.R. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F. Aplicação de diferentes citocininas para indução e multiplicação de brotações de repolho (*Brassica oleracea* var. capitata L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.3, p.384-389, 1998

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.

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

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

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.; ZEIGNER, E. **Fisiologia vegetal**, 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, p.548, 2013.

TOMBOLATO AFC; COSTA AMM. 1998. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agronômico. 72 p. (Boletim técnico, 174).

VALLES, M.; BOXUS, P. Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. **Acta Horticulture**, v.10, p.337-334, 1987.

VAN DER PJJL, L.; DODSON, C.H. Orchid flowers: their pollination and evolution. **University of Miami Press**, Coral Gables, 1966.

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

CAPÍTULO 1- MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE) APARTIR DE EXPLANTES RADICULARES.

RESUMO

O potencial de regenerativo das raízes da família das orchidaceae cultivadas *in vitro* depende em grande parte do nível e tipo de fitorregulador. Objetivou-se determinar um protocolo para obtenção de mudas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne pela técnica de propagação *in vitro* com fragmentos radiculares. Foram utilizados dois fitorreguladores, ácido 1-naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) nas concentrações: ANA (0,00; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) e TDZ (0,00; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹), em meio Knudson. Os explantes foram seccionados e permaneceram durante 90 dias em meio de cultura. Após foram avaliados número de brotos, folhas e raízes do maior broto e calogênese. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3, com cinco repetições. Para número de brotos a presença de TDZ foi determinante quando o meio foi acrescido de 0,50 mg L⁻¹ de TDZ isolado. Para número de folhas o melhor resultado foi na ausência de ANA e TDZ. Em relação ao número de raízes a concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA demonstrou melhor resultado. A concentração de 0,50 mg L⁻¹ de TDZ isolado mostrou –se recomendada para a indução de brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne.

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

CHAPTER 1- MICROPROPAGATION *IN VITRO* *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE) APPEARING OF RADICULAR EXPLANATIONS.

ABSTRACT

The regenerative potential of the roots of the *in vitro* orchid family depends on the great part of the control and the type of phyto regulator. The goal of this project is to determine a protocol to obtain seedlings of *Catasetum rooseveltianum* Hoehne by the technique of propagation *in vitro* with root fragments. Were used two phyto regulators, naphthalene acetic acid (NAA) e thidiazuron (TDZ) in the concentrations : NAA (0,00; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) e TDZ (0,00; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹), through Knudson. The exemplars were selected and remained for 90 days in culture medium. After were evaluated the numbers of sprout, leaves and roots of the biggest sprout and calogenesis. The experimental desing was on factorial scheme 3x3, with five repetitions. The number of shoots in the presence of TDZ was determined when the environment was add 0,50 mg L⁻¹ of TDZ isolated. For the numbers of leaves the best result was in the absence of NAA E TDZ. The Number of roots with the concentration of 0,25 mg L⁻¹ de NAA showed better results. The concentration of 0,50 mg L⁻¹ de TDZ isolated showed recommended for the induction of shoots de *C. rooseveltianum* Hoehne.

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

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Catasetum* pertence a subtribo das Epidendroideae (Orchidaceae) que apresentam desenvolvimento em áreas tropicais da América do Sul e Central (MORAES et al., 2011), possui alta valorização em termos comerciais, devido ao interesse de inúmeros colecionadores, como orquidólogos (MELO et al., 2015).

Pelo fato de apresentarem processo de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo muito lento, o cultivo *in vitro* se torna técnica de multiplicação viável, pois segundo (FARIA et al. 2006), esta técnica de cultura de tecidos permite acelerar o processo de propagação. O que conseqüentemente proporciona a multiplicação em grandes quantidades para a comercialização de mudas e sua inclusão no meio ambiente.

Nos últimos anos, a micropropagação de orquídeas vem apresentando resultados satisfatórios, entretanto a dificuldade de induzir a formação de corpos semelhantes a protocormos (“protocorms-like body” - PLB) e a variação somaclonal devido ao número limitado de meristemas, têm restringido a escolha de explantes (CHUGH; GUHA; RAO, 2009). Apesar de induções de PLBs a partir de tecidos radiculares não serem comumente utilizadas, alguns autores obtiveram resultados promissores quanto a sua utilização em orquídeas, como (PERES; KERBAUY (1999) e Fritsche (2012).

Isto, segundo (FRITSCHE, 2012) se deve ao fato de que, a obtenção de PLBs a partir de explantes radiculares, apresenta maior quantidade de material disponível para inoculação quando este é comparado às gemas da parte aérea, sendo que, o dano causado a planta matriz também é reduzido consideravelmente, o que torna seu emprego altamente desejável.

De acordo com (MORAES et al., 2011), o tecido meristemático radicular da *Catasetum rooseveltianum* Hoehne possui grande capacidade de multiplicação e especialização das células em meristemas caulinares quando isoladas e colocadas *in vitro*. Com esta característica, a espécie *C. rooseveltianum* Hoehne pode apresentar a capacidade de induzir PLBs a partir do tecido radicular.

Na técnica de micropropagação são utilizados vários tipos de fitorreguladores, assim como suas concentrações. Na maioria dos casos utilizam principalmente, auxina e citocinina, as quais são essenciais para indução, crescimento e

morfogênese de células *in vitro* (CHAPLA et al., 2009), por exercerem controle no ciclo celular (RODRIGUES, 2007).

As auxinas possuem maior efetividade na promoção de enraizamento, podendo ser utilizada isoladamente ou combinadas no processo de indução de raízes. As principais auxinas utilizadas são o ácido indol 3- butírico (AIB), o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido indol acético (AIA) e o ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) (ALVARENGA et.al, 1983).

Enquanto as citocininas estimulam a divisão celular e em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes. O thidiazuron (TDZ) é uma das citocininas que vem sendo mais utilizado, devido a sua aplicação *in vitro* produzir uma taxa elevada de brotos.

As interações entre as auxinas e as citocininas são consideradas as mais importantes para o controle do crescimento e desenvolvimento organizados dos vegetais (SKOOG; MOLEIRO, 1957, GASPAR et al., 1996). Davies (2004) observou que as citocininas tem um grande potencial na indução da divisão celular, em conjunto com as auxinas.

Sabe que a aplicação de fitorreguladores afeta os níveis de hormônios endógenos (BERTELL; ELIANSSON, 1992; ETIENNE et al., 1993; RIBNICKY et al., 1996), que deve ser levado em consideração na interpretação das características fisiológicas da planta, por isso é importante estabelecer um equilíbrio hormonal desses fitorreguladores.

Espera –se que, por meio deste trabalho possa obter mudas a partir da interação de ácido naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) no processo de micropropagação, devido à importância desses fitorreguladores no processo de crescimento e morfogênese das células *in vitro*. Objetivou determinar um protocolo para obtenção de mudas de *C. rooseveltianum* Hoehne pelo uso de técnicas de micropropagação *in vitro* com fragmentos radiculares, em meio de cultivo Knudson, com o uso de fitorreguladores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Câmpus de Chapadão do Sul – MS. Do qual foram utilizadas raízes de aproximadamente 3,0 cm, obtidos de plantas de *C.*

rooseveltianum Hoehne, através do processo de germinação assimbiótica e cultivadas *in vitro* em meio Knudson (KNUDSON, 1946).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3, sendo três concentrações de ANA (0,00; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) e três concentrações de TDZ (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) resultando em nove tratamentos com cinco repetições. Foi utilizada a formulação do meio Knudson (Knudson 1946) suplementado com 20,0 mg L⁻¹ de sacarose e 5 mg L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1; em seguida foi esterilizado em autoclave a 120 °C e 1 atm.

Na capela de fluxo laminar foram seccionadas as porções radiculares com um auxílio do bisturi em ápice, meio e base, medindo ~1cm e inoculados em frascos de 250 mL contendo 70 mL de meio de cultura Knudson, suplementado com concentrações de ANA (0,00; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹) e de TDZ (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) para indução de brotos.

Após serem inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento onde permaneceram em condições controladas de temperatura (27±2 °C) e fotoperíodo de 16h de radiação luminosa com intensidade de 30 μmol.cm⁻².s⁻¹, por 90 dias. Foram analisados número de brotos, número de folhas e raízes do maior broto e número de calos.

Os dados coletados foram percentualizados e submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que as concentrações dos fitorreguladores interferiram diretamente na indução de brotação pelo processo de micropropagação das plantas de *C. rooseveltianum* Hoehne (Tabela 1), houve interação significativa entre os fitorreguladores ANA e TDZ nas variáveis número de brotos região mediano e basal, número de folhas região apical e número de raízes região basal houve efeito isolado de TDZ nos parâmetros número de brotos região apical, números de folhas região basal e número de raízes região mediana e basal.

Tabela 1. Resumo de análise de variância do número de brotos (NB), folhas (NF) e raízes (NR) do maior broto e número de calos (CA) presentes em explantes obtidos a partir das porções apical (A), mediana (M) e basal (B) de raízes de vitroplantas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne com combinações de fitoreguladores.

F	GL	Quadrado Médio											
		N			N			N			C		
		A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B
ANA	2	6,23 ⁿ	1,35 ⁿ	21,23 ⁿ	12,02	0,15 ⁿ	2,95 ⁿ	3,62 ⁿ	4,06 ⁿ	0,08 ⁿ	0,02 ⁿ	0,01 ⁿ	0,08 ⁿ
TDZ	2	79,00*	72,93	67,53*	4,42*	2,48 ⁿ	11,82*	16,42*	15,80	16,82	0,15 ⁿ	0,02 ^{ns}	0,08 ⁿ
ANA*TDZ	2	5,56 ^{ns}	35,40	39,76*	4,58*	1,92 ⁿ	2,65 ^{ns}	2,45 ^{ns}	1,96 ^{ns}	6,82*	0,08 ⁿ	0,02 ^{ns}	0,08 ⁿ
RE	3	9,56	9,01	12,7	1,14	1,32	2,26	1,55	1,37	0,84	0,13	0,02	0,08
CV(%)		92,94	80,1	100,	56,6	83,4	84,69	130,	135,	82,7	33,53	14,5	28,55
TOTAL	44												

* Significativos a 5% de probabilidade pelo teste de tukey, respectivamente, pelo teste F, NS não significativo.

O efeito isolado de TDZ na concentração de 0,5 mg L⁻¹ obteve o maior número de brotos na região apical do explante, já na ausência do fitoregulador pode-se observar o maior número de folhas na região basal e raízes na região apical e médio do explante (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito isolado de thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotos (NB) região apical (A), número de folhas (NF) região basal (B) e número de raízes (NR) região apical (A) e mediana (M) do maior broto.

TDZ (mg L ⁻¹)	NB(A)	NF(B)	NR(A)	NR(M)
0,00	0,80 b	2,80 a	2,13 a	2,00 a
0,50	5,30 a	1,33 b	0,60 b	0,60 b
1,00	3,83 a	1,20 b	0,13 b	0,00 b

Média seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidades.

Para variável número de brotos, foi significativo quanto utilizou 0,50 mg L⁻¹ de TDZ, segundo Nayak, Rath e Satyanarayan (1997), trabalhando com micropropagação de orquídeas, o TDZ possui efeito inibitório na regeneração de brotos, quando utilizado em concentrações acima do nível ótimo.

A variável número de folhas e raízes o tratamento com ausência de TDZ obteve o melhor resultado. Essas observações foram similares àquelas obtidas por (SOUZA et al., 1998), quando trabalhou com repolho (*Brassica oleracea* L.),

segundo o estudo, o contato prolongado do TDZ com o tecido acaba inibindo o seu crescimento e conseqüentemente não há o desenvolvimento de raízes.

A interação entre as variáveis número de brotos, folhas e de raízes do maior broto e número de calos (calogênese) em função de concentrações de ANA e TDZ estão dispostos na Tabela 3.

As maiores médias de explante com brotos foram obtidos nos tratamentos no qual o meio de cultura suplementado com concentração de 0,50 mg L⁻¹ de TDZ obteve o maior número de brotações que diferiu estatisticamente dos demais (Fig. 1a e Tabela 3). Estes dados ressaltam a importância das citocininas na conversão de porções radiculares em PLBs.

Tabela 3. Tratamentos de Thidiazuron (TDZ) quanto ao número de brotos (NB), folha (NF) e raiz (NR) do maior broto em função do aumento de concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) ao meio de cultivo Knudson, para a micropropagação de plantas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne.

Parâmetro	Explante	ANA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)		
			0,00	0,50	1,00
NB	Médio	0,00	1,80 Ab	7,10Aa	1,40 Bb
		0,25	1,00 Ab	3,60 Aa	7,50 Aa
		0,50	0,80 Ab	4,10 Aa	6,40 Aab
	Basal	0,00	1,40 Ab	9,80 Aa	3,10 Ab
		0,25	1,80 Aa	2,10 Ba	6,30 Aa
		0,50	0,40 Aa	4,10 Aa	2,10 Aa
NF	Apical	0,00	3,60 Aa	2,20 Aa	1,80 Aa
		0,25	3,20 Aa	2,40 Aab	1,20 Ab
		0,50	0,00 Bb	1,80 Aa	0,80 Aab
NR	Basal	0,00	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
		0,25	4,00 Aa	0,00 Bb	0,00 Bb
		0,50	3,00 Aa	1,60 Aab	1,40 Ab

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

De acordo com (PERES; KERBAUY, 1999), em estudo sobre as relações entre estes fitorreguladores na conversão de ápices radiculares seccionados de orquídeas em brotos, verificaram uma alteração no balanço hormonal favorável também às citocininas.

Estudos realizados por (NOVAK et al., 2014), mostram também para a manutenção de desenvolvimento de PBLs, a aplicação de auxina exógena promove

um estado indiferenciado, mas a redução ou remoção de auxina do meio de cultura resulta na conversão de embriões somáticos em brotos de *Catasetum fimbriatum*.

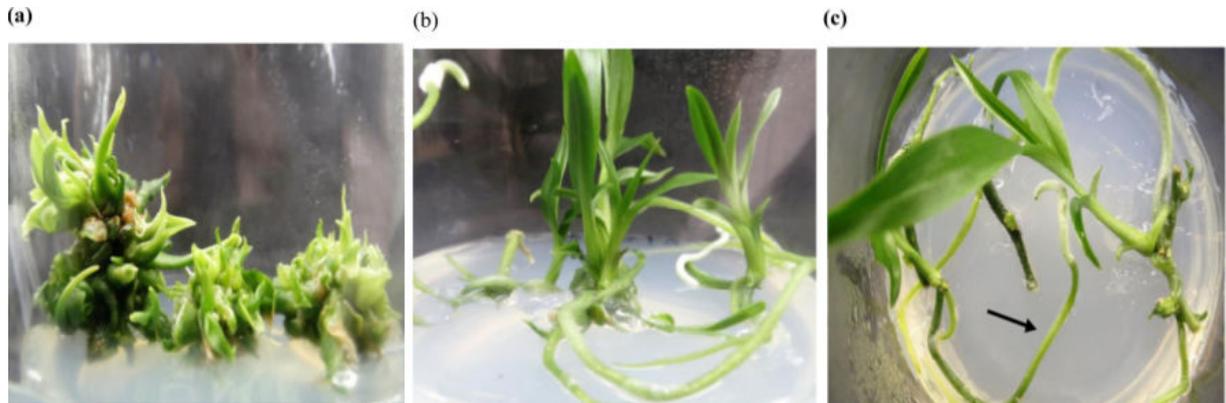


Figura 1. Frasco contendo protocormos de *C. rooseveltianum* Hoehne obtidos através da micropropagação *in vitro* com TDZ $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ isolado aos 90 dias de cultivo (a); Frasco com ausência de fitorreguladores contendo o maior número de folhas (b); Raízes na parte basal do explante (seta), obtida através ANA $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ isolado (c)

De acordo com (RODRIGUES; KERBAUY, 2009), espécies pertencentes ao gênero das *Catasetum* indicam elevado grau de complexidade e de plasticidade de respostas fisiológicas e morfológicas sobre os meristemas apicais de suas raízes. Tornando o processo de multiplicação *in vitro* viável.

Foi observado que a ausência de fitorreguladores na região apical do explante promoveu o maior número de folhas (Fig. 1b e Tabela 3). Isso se deve pela auxina ser promotora de crescimento e desenvolvimento vegetal do qual é sintetizada no ápice caulinar é transportada basipetalmente aos tecidos adjacentes (TAIZ; ZEIGNER, 2013).

Segundo (NOVAK et al. 2014), o ápice de raízes de orquídeas em meio de cultura sem fitorreguladores exógenos, faz com que desloquem uma alta relação entre auxina e citocinina endógena para o desenvolvimento e crescimento de estruturas vegetativas. Essa relação entre auxina e citocinina é essencial para o crescimento e morfogênese das células *in vitro*.

Em relação ao número de raízes a auxina (ANA) foi mais efetivo na indução de raízes que as citocininas (TDZ). A região basal do explante obteve resultado significativo onde o tratamento com $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA isolado obteve o maior

número de raízes (Fig. 1c e Tabela 3), em estudos com *Cyrtopodium sainttlegerianum* concentrações de até 4 mg L⁻¹ foram favoráveis para indução de raízes (SILVA et al., 2013).

Esses dois fitorreguladores (ANA e TDZ) interagem no controle da dominância apical, sendo que a relação é antagônica, uma vez que a auxina (ANA) impede o crescimento de gemas laterais enquanto a citocinina (TDZ) estimula esse crescimento. Na formação de raiz a relação é invertida, a auxina (ANA) estimula seu crescimento e a citocinina (TDZ) inibe esse crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013, CASTRO et al., 2005).

Os dados obtidos neste trabalho não houve um equilíbrio hormonal desejável dos fitorreguladores (ANA e TDZ), nos quais foram obtidos em estudo com *Cyrtopodium paludicolum* (PICOLLOTO et al., 2017). No entanto, ficou evidenciado que o uso de fitorreguladores em meio de cultura para indução de brotos a partir de raiz depende da espécie e do gênero.

4 CONCLUSÃO

A interação entre o ANA e o TDZ interfere negativamente na micropropagação de *C. rooseveltianum* Hoenhe a partir de segmentos radiculares.

A concentração de 0,50 mg L⁻¹ de TDZ isolado mostrou-se mais eficiente na indução de brotos, sendo recomendado para multiplicação *in vitro* de *C. rooseveltianum* Hoehne a partir de bases radiculares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo horizonte, v.9, n.101, p.47-55, 1983.

CASTRO, P. R.; KLUGE, R. A.; PERES, E. P. **Manual de fisiologia vegetal: Teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CHAPLA, P. I. et al. pH, Carvão ativo e agentes geleificantes no meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.5, n.2, p. 87-93, 2009.

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

DAVIES, P.J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**. 3.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 750p

FRITSCHÉ, YOHNAN. **Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture. **In Vitro Cellular Development Biology–Plant**, v.32, p.272-289, 1996.

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

MELLO, V. dos et al. Determinação do número de cromossomos de *Catasetum denticulatum* F.E.L. Miranda (Orchidaceae). **Revista Cáceres**, v. 2, n. 1, 2015.

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; SATYANARAYAN, P. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch and *Dendrobium*. **Scientia iculturae**, n. 280, mar./abr., p.243 250, 1997.

NOVAK, et al. Role of Auxin in Orchid Development, **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, p. 1-8, 2014.

PEDROSO-De-MORAES, C. et al, Radicular anatomy of twelve representatives of the *Catasetinae* subtribe (Orchidaceae: Cymbidieae), **Anais da Academia Brasileira de Ciências** , v. 84, p. 455-467, 2011.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

RODRIGUES, M.A.; KERBAUY, G.B. 2009. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**. v.3, n.36; p.525-549, 2009.

RODRIGUES, M.A., FRESCHI, L.; KERBAUY, G.B.; Effects of auxin transport on competence acquisition to root apical meristem conversion of *Catasetum fimbriatum* into buds. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 43: 49, 2007.

SILVA, D. M. et al. Efeitos 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.

SKOOG, F.; MOLEIRO, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology** v. 11, p.118–131, 1957

SOUZA, C.M. de; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, B.M.; MALUF, W.R.; MORAIS, A.R. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F. Aplicação de diferentes citocininas para indução e multiplicação de brotações de repolho (*Brassica oleracea* var. capitata L.) in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.3, p.384-389, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGNER, E. **Fisiologia vegetal**, 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 548.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO ALONGAMENTO DE BROTOS DE *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE).

RESUMO

O uso de fitorreguladores, pode otimizar a propagação *in vitro* de plantas de orquídeas, sendo, portanto, uma maneira viável de aumentar a qualidade das mudas micropropagadas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de alongamento *in vitro* de brotos de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne com concentrações de ácido giberélico (GA₃). Os brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne foram inoculados em frascos contendo 70 ml de meio Knudson, acrescidos de GA₃ (0,00; 3,00; 6,00; 9,00 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Após 60 dias foram avaliados os parâmetros: comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de raízes e massa fresca do broto. Para comprimento da parte aérea, número de raízes e massa fresca não houve interação entre as doses de GA₃. Para o comprimento da raiz e massa fresca do broto, a ausência de GA₃ proporcionou o melhor resultado. O uso de GA₃ contribui negativamente para o alongamento de brotações *in vitro* de *C. rooseveltianum* Hoehne, sendo desnecessário a utilização deste fitorregulador na produção de mudas.

PALAVRAS- CHAVE: Fitorreguladores, GA₃, Orchidaceae.

CHAPTER 2- *Catasetum rooseveltianum* (HOEHNE) STRETCHING UNDER THE EFFECT OF GIBERELIC ACID.

ABSTRACT

The use of phyto regulators can optimize an *in vitro* propagation of orchid plants and is therefore a viable way to increase the quality of micropropagated seedlings. The objective of this work is to establish a protocol for *in vitro* monitoring of shoots of *Catasetum rooseveltianum* Hoehne with concentrations of gibberellic acid (GA₃). The shoots of *C. rooseveltianum* Hoehne were inoculated into flasks containing 70 ml of Knudson medium, plus GA₃ (0.00, 3.00, 6.00, 9.00 mg L⁻¹). The experimental design was entirely performed in regression analysis containing four treatments with five replicates. After 60 days, it has control of the parameter: shoot length, root length, number of roots and fresh mass. Parameters of aerial part, number of root and fresh mass did not interact between doses of GA₃. Root parameter and fresh mass, an absence of GA₃ provided the best result. The use of GA₃ contributes negatively to the elongation of *in vitro* shoots of *C. rooseveltianum* Hoehne, and it is unnecessary to use this phyto regulator in the production of seedlings.

KEY WORDS: Phyto regulators, GA₃, Orchidaceae.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae sendo conhecida como uma das famílias botânicas mais numerosas, são plantas muito apreciadas pela beleza de suas flores e que contém inúmeras espécies de elevado valor ornamental (BELLAYER et al., 2015).

Nos últimos anos o Brasil aumentou a produção de flores atingindo importância significativa no mercado internacional, sendo que o cultivo *in vitro* foi essencial para produzir plantas com maior qualidade e valor comercial (MATA-ROSAS et al., 2011). No entanto, o cultivo e comércio dessas plantas, tem sido feito através do extrativismo predatório do qual aliado a urbanização e o aumento das áreas agrícolas tem contribuído com a extinção de várias espécies de orquídeas (GALDIANO et al. 2013).

Dentre muitas espécies de orquídeas brasileiras encontra-se *Catesetum rooseveltianum* Hoehne, que pertence a subtribo Epidendroideae, comum em áreas tropicais das Américas do Sul e Central (MORAES et al., 2011). As espécies desta subtribo são reconhecidas pelos seus pseudobulbos possuindo vários entrenós, pelas flores unissexuais e polinário com estipe, caudículo e viscidio (REIS, 2015).

O cultivo *in vitro* ou micropropagação de orquídeas, ocorre de forma similar ao desenvolvimento observado em condições naturais (BELLAYER et al., 2015), onde os meios de cultura utilizados possuem a capacidade de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento das plantas e são formados por sais inorgânicos, possuindo ainda sacarose como fonte de carboidrato, aminoácidos, vitaminas e proteínas específicas (BUTCHER; INGRAM, 1976; DIXON, 1985).

A composição do meio de cultura e as concentrações dos fitorreguladores usados no cultivo *in vitro*, são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento das plantas, por exemplo o ácido giberélico (GA_3), não é comumente incluído nos meios de cultivos, em razão do suprimento endógeno ser suficiente para os processos morfológicos (CALDAS et al., 1999). No entanto mudas produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas, devido ao seu tamanho reduzido, o cultivo na presença de GA_3 , pode provocar alongamento nas regiões vegetativas em algumas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e, como consequência maior números de mudas poderá ser aclimatizada.

Em orquídeas, o ácido giberélico é comumente utilizado no meio de cultura visando estimular o desenvolvimento do embrião, e também na indução do florescimento, mediante a pulverização (CHEN et al., 1994). Em estudo realizado por (RODRIGUES et al. 2007), com o cultivo *in vitro* *Cattleya loddigessi* em meio de cultura Knudson C, acrescido com 10 mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou maior comprimento das plântulas. Resultados semelhantes foram obtido em plantas como macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.], onde 0,50 mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou crescimento satisfatório dos explantes (DINIZ et al., 2003).

Vários protocolos de cultivo foram propostos para as orquídeas (VUNAJOVIC et al., 2000; ROY; BANERJEE, 2002; PARK et al., 2003); no entanto, mudanças no protocolo são necessárias para atender às necessidades específicas de cada material genético (CALDAS et al., 1999). Em *Catasetum rooseveltianum* Hoehne não há estudos de cultivo *in vitro* com este fitorregulador.

Devido os ácidos giberélicos (GAs) estarem envolvidos em diversas respostas no crescimento de plantas, espera-se obter maior alongamento dos pseudobulbos de brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne com o uso de GA₃, em meio de cultura. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de alongamento *in vitro* de brotos de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne com concentrações de ácido giberélico (GA₃), usando as técnicas de micropropagação *in vitro* em meio de cultura Knudson.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, câmpus de Chapadão do Sul – MS. Foram utilizados brotos em cultivo *in vitro* de *C. rooseveltianum* Hoehne.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, os tratamentos foram, quatro doses de GA₃ (0,00; 3,00; 6,00 e 9,00 mg L⁻¹) com cinco repetições.

Foi utilizada a formulação do meio Knudson (KNUDSON, 1946), suplementado com 20,0 mg L⁻¹ de sacarose e 6 mg L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, em seguida o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm.

Na capela de fluxo laminar o ácido giberélico (GA₃) filtro estéril foi adicionado de acordo com os tratamentos ao meio de cultura Knudson enquanto não gelificado, com concentrações de 0,00; 3,00; 6,00 e 9,00 mg L⁻¹.

Em seguida em fluxo laminar os explantes adquiridos de cultivo *in vitro* assimbiótico de *C. rooseveltianum* Hoehne, foram transferidos para frascos de 250 mL contendo 70 mL de meio de cultura Knudson e vedados com filme plástico PVC. Os frascos foram acondicionados em sala de crescimento onde permaneceram em condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 16 horas com $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, provenientes de lâmpadas led (40W, Philips, extra luz do dia), por 60 dias. Após esse período, foram analisados os parâmetros de: comprimento da parte aérea (cm) e comprimento da raiz (cm) com o auxílio de uma régua de 30 cm, número de raízes e massa fresca (g) de brotos onde foi pesada em balança analítica da marca Bell Engineering, classe II.

Os dados foram percentualizados e submetidos à análise de regressão no qual foi utilizada para verificar o ajuste de modelos polinomiais, em função das concentrações de GA_3 em nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 60 dias após a inoculação de brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne, observou que a presença de GA_3 nas concentrações avaliadas não foram estimulatórias no alongamento da parte aérea.

O comportamento de explantes de *C. rooseveltianum* Hoehne para as variáveis, comprimento da parte aérea e número de raiz, em relação as concentrações de ácido giberélico não foram significativas. No entanto, as variáveis comprimento de raiz e massa fresca de brotos foram significativas para concentrações GA_3 (Tabela 1).

De acordo com (TAIZ; ZEIGNER, 2013), as giberelinas também atuam no meristema apical caulinar juntamente com as citocininas e de maneira antagônica sendo que o balanço hormonal nesta região é favorável as citocininas. Assim, garantindo a manutenção da divisão celular e a inibição da diferenciação, podendo justificar as variáveis acima.

Tabela 1. Análise de variância referente ao crescimento e desenvolvimento das plantas de *Catasetum rooseveltianum* Hoehne submetidas com concentrações de GA₃. Variáveis analisadas: comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CPR) e massa fresca de brotos (MF) das regiões apical (A), mediana (M) e basal (B).

F	GL	Quadrado											
		CPA			N			CPR			M		
		A	M	B	A	M	B	A	M	B	A	M	B
GA	3	0,53 ⁿ	0,82 ⁿ	0,38 ⁿ	0,47 ⁿ	0,90 ⁿ	0,15 ⁿ	0,29 ⁿ	0,91 ⁿ	0,02*	0,65 ⁿ	0,27 ⁿ	0,00*
Re	9												
CV(%)		55,94	54,90	41,26	65,21	98,97	64,87	70,00	124,22	71,74	92,36	68,88	40,60
TOTAL	15												

* Significativos a 5% de probabilidade, pelo teste F, NS não significativo.

Este fato pode ter ocorrido também, devido as concentrações de GA₃ utilizada ter sido insuficiente para retomar a atividade do meristema caulinar, ou que não apresentam efeito no alongamento do mesmo, já que existe uma concentração endógena adequada de GA₃ nesses brotos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo de (SUZUKI et al., 2010), com *Catasetum fimbriatum* Lindl. & Paxt no qual a presença GA₃ no cultivo *in vitro* dessa espécie sob 16 horas luz também não proveu no alongamento significativo dos seus pseudobulbos.

Quanto ao comprimento de raiz, foi significativo, onde a ausência deste fitorregulador proporcionou o aumento dessa variável, apresentando raízes com 6,25 cm, no qual as doses crescentes deste fitorregulador influenciaram negativamente em seu desenvolvimento (Figura 1 e 2).

Segundo (PUTZ, 1971), citado por (GEORGE, 1993), a inibição no desenvolvimento do sistema radicular ocorre, principalmente se a concentração de GA₃ utilizada promover o crescimento de meristemas isolados ou extremidades de brotações.

Os resultados são similares com (ARAUJO et al., 2009), que estudando plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* e *Cattleya loddigesii*, observaram que a GA₃ também proporcionou efeito inibitório no comprimento de raízes, sendo assim, um fitorregulador não decisivo para o alongamento das mesmas.

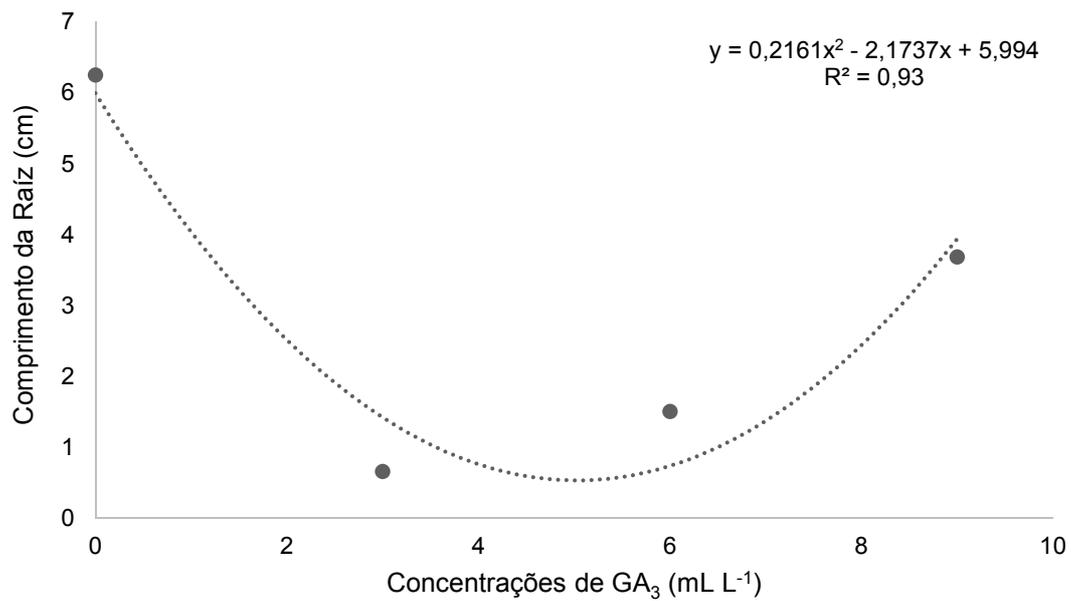


Figura 1. Comprimento da raiz de brotos de *Catasetum rooseveltinum* Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (GA₃).



Figura 2. Brotos de *C. rooseveltianum* Hoehne obtidos através da micropropagação *in vitro* com GA₃ aos 60 dias de cultivo. Tratamento um (T1) com a ausência e tratamento dois (T2) com 3,00 mg L⁻¹ de GA₃.

Segundo (TAIZ; ZEIGNER, 2013), a biossíntese da GA₃ ocorre em múltiplos órgãos vegetais e em múltiplos sítios celulares, sendo altamente móveis, podendo atuar localmente ou distante dos seus sítios de síntese, dos quais estão localizados nos embriões em germinação, plântulas jovens, ápices caulinares e sementes em lefeito no crescimento da raiz.

Quanto à massa fresca de plantas de *C. rooseveltianum* Hoehne, foi observado que na ausência de GA₃ ocorreu aumento dessa variável, com massa de 1,85 g, respectivamente as doses crescentes do fitorregulador influenciaram negativamente em seu desenvolvimento (Figuras 3).

De forma similar, (ARAUJO et al., 2005), testando GA₃ em *Laeliocattleya Irene Finney* X *C. walkeriana*, e (SOARES et al., 2009), em *C. loddigesii* e *H. lobata* x *H. purpurata*, verificaram melhores resultados para a produção de massa fresca de plantas na ausência desse fitorregulador.

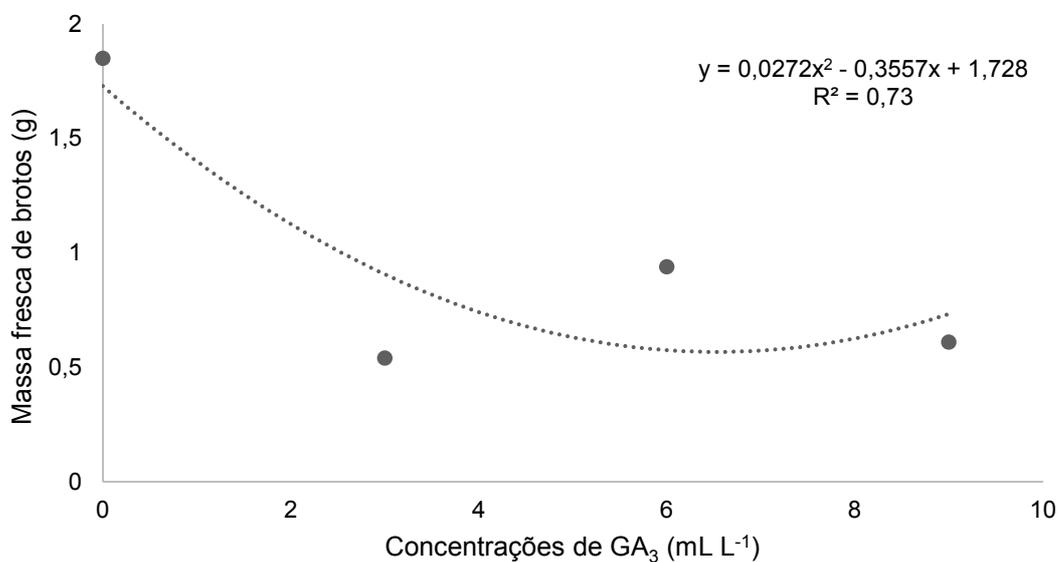


Figura 3. Massa Fresca de brotos de *Catasetum rooseveltinum* Hoehne, em função das concentrações de ácido giberélico (GA₃)

Para o sucesso no processo de cultivo *in vitro*, é necessário ajustar, para cada espécie e/ou cultivar, as melhores condições de cultivo (ZIMMERMAN, 1981), ou seja, concentrações mais apropriadas de fitoreguladores e ambiente no qual serão mantidos os explantes. Por isso há necessidade de testar esse fitorregulador em diferentes fases de desenvolvimento da planta.

4 CONCLUSÃO

O uso de ácido giberélico contribui negativamente para o alongamento de brotações *in vitro* de *Catasetum rooseveltinum* Hoehne, tornando desnecessário a utilização deste fitorregulador na produção de mudas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, A.G. et al. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.5, p.542-546, 2009.
- ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, A. L. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira**, v.2, n.3, supl., 2005
- BELLAVER, L. A et al. Regeneração *in vitro* de *Cyrtopodium Paranaense* SCHLTR (Orchidaceae) a partir das regiões meristemáticas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p.100-109, 2015.
- BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. Organs and embryos. In **Plant Tissue Culture**. [s. l.]: Edwad Publishing Limited, p. 3-15, 1976.
- DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON R. R. (ed). **Plant Cell Culture: A Pratical Approach**. Washington DC: IRL Press, p.1-20, 1985.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultivo de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa – SPI/Embrapa**, CNPH, 1999.
- CHEN, W. E.; LIU, H. Y.; LIU, Z. H.; YANG, L.; CHEN, W. H. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 391-395, Feb. 1994.
- DINIZ J. D. N.; ALMEIDA J. A.; TEXEIRA A. A.; GOMES E. D.; HERNANDEZ F. F.; Ácido giberélico (GA₃) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p.934-938, 2003.
- GALDIANO, R. F. Jr. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigessi Lindley*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.1, p.583-591, 2013.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. **The technology**, Edington: Exegetics, Part 1. 574p, 1993.
- GRATTAPAGGLIA D.; MACHADO M., Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS ; Buso JA. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília, EMBRAPA/CNPH. p.183-260, 1998.

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

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.

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.

PICOLLOTO, D. M.; PAIVA NETO, V. B.; BARROS, F. de.; PADILHA, D. R. C.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C. Micropropagation of *Cyrtopodium paludicolum* (Orchidaceae) from root tip explants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17, p. 191-197, 2017.

MORAES, C. P. et al. Radicular anatomy of twelve representatives of the Catasetinae subtribe (Orchidaceae: *Cymbidieae*), **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 455-467, 2011.

REIS, MIGUEL. M. et al. O gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) no Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, V.42, n.1, p. 185-194, 2015.

RODRIGUES J. D.; ARAUJO A. G. de; PASQUAL M.; FERREIRA E. A.; ROCHA H. S.; RODRIGUES F. A, Ácido giberélico e número de explantes na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, n.3; p.78-82, 2007.

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**, v. 94, 2002, p. 181-192.

SOARES J. D. R.; Araújo A. G de; PASQUAL M; RODRIGUES F. A; ASSIS F. A de, Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, n.39; p.772-777, 2009.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; PESCADOR, R.; PURGATTO, E.; Ceccantini, G.C.T.; FERREIRA, W.M., Dark- induced hormone changes coincide with the resupition of light- inhibited shoot growth in *Catasetum fibriatum* (Orchidaceae). **J. of Plant Phisyol.** v. 167, p. 375- 381, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGNER, E. **Fisiologia vegetal**, 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, p.584-587, 2013.

VUJANOVIC, V. et al. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany**, v. 86, p. 79-86, 2000.