

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Viviane Barbosa Freitas

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, TIPO E CONCENTRAÇÃO DE
CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* HOOK.**

**DOURADOS - MS
Março/2017**

Viviane Barbosa Freitas

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, TIPO E CONCENTRAÇÃO DE
CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* HOOK.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

**DOURADOS - MS
Março/2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F866i Freitas, Viviane Barbosa

INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, TIPO E CONCENTRAÇÃO DE
CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata*
HOOK. / Viviane Barbosa Freitas -- Dourados: UFGD, 2017.

31f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Cláudia Roberta Damiani

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Orquídeas. 2. Micropropagação. 3. Regulador de crescimento. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

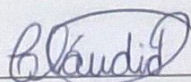
Viviane Barbosa Freitas

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, TIPO E CONCENTRAÇÃO DE
CITOCININA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* HOOK.**

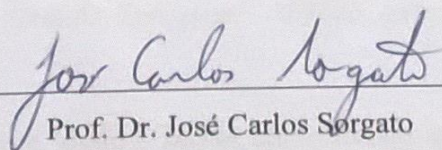
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados, como
parte das exigências do curso de Bacharelado em
Biotecnologia, da Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais, sob a orientação da
Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

Apresentado em 31/03/2017.

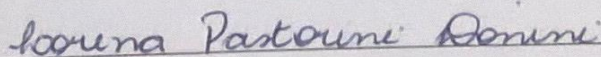
BANCA EXAMINADORA



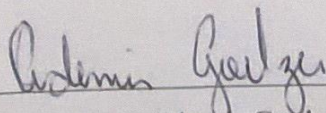
Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)



Prof. Dr. José Carlos Sorgato



Dra. Lorena Pastorini Donini



Bel. Ademir Goelzer

AGRADECIMENTOS

No decorrer da faculdade algumas pessoas sempre estiveram ao meu lado e de alguma forma ou de outra me ajudaram a percorrer este caminho, desde uma simples carona até conselhos para a vida toda. Afinal, nenhuma batalha é vencida sozinha.

Primeiro, agradeço a DEUS que me permitiu chegar onde estou e concede a graça de perceber a beleza da sua criação.

À professora Dra. Cláudia Roberta Damiani, pela orientação e confiança durante o período de pesquisa e esforço em fazer do curso o que é hoje.

Aos professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por todo o exemplo de dedicação como profissional e conhecimento transmitido durante o período de graduação.

Aos meus familiares, minha mãe Vanilda e ao meu pai Artur, meus irmãos Wagliane, Dhione e Vivian, por todo amor, carinho e incentivo. E ao meu noivo Michael pela ajuda e atenção, pelo esforço e companheirismo.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por sempre estarem a disposição para auxiliar no dia a dia do laboratório.

A todos os colegas de laboratório do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal, pela disposição em ajudar e pelo convívio durante este período.

Aos colegas da V turma da Biotecnologia, em especial a Rafaela Pereira Duarte, a Joyce Anne Coltro e o Romário Oliveira de Sales, por sempre estarem comigo, pela ajuda e incentivo.

À Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, pelo espaço cedido e pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada.

“Passado não volta, futuro não temos e o hoje não acabou. Por isso ame mais, abrace mais. Pois não sabemos quanto tempo temos para respirar. Vale a pena lembrar que a vida é curta demais”.

(Thiago Brado)

RESUMO

Brassavola tuberculata Hook., mais conhecida popularmente como “cebolinha” devido a sua folha cilíndrica ou ligeiramente afunilada, é uma orquídea nativa e epífita, que apresenta inflorescências com grande número de flores, perfume agradável, longo período de floração e durabilidade das flores, caracterizando um elevado potencial ornamental. Outra característica importante da espécie é a possibilidade de cruzamentos com outros gêneros e a obtenção de novos híbridos. Considerando a importância da espécie, o desenvolvimento de protocolos eficientes de propagação *in vitro* torna-se necessário para garantir a produção de mudas, seja para fins comerciais ou para conservação da mesma. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de *B. tuberculata*, utilizando explantes nodais caulinares com três folhas cada, obtidos de microplantas previamente germinados *in vitro*. Para atingir o objetivo proposto foram avaliados o cultivo em meio WPM suplementado com diferentes tipos de citocininas com concentração de 5,0 mg L⁻¹ (BAP, 2iP e Zea), com e sem a presença de carvão ativado na concentração de 1,0 g L⁻¹, bem como, o desempenho da *B. tuberculata* cultivada em meios de cultura MS e WPM suplementados com diferentes concentrações de BAP (0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹). Após 60 dias de cultivo, concluiu-se que para a multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata*, para obtenção de maior número de folhas e alongamento das brotações recomenda-se o uso de BAP associado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado. Quanto às concentrações testadas de BAP e meio de cultura, os resultados indicam que, nas concentrações testadas o uso de 2,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS, favorece o desenvolvimento das brotações e de folhas. O cultivo em meio WPM favorece o enraizamento, prejudicando o desenvolvimento da parte aérea.

Palavras-chave: Orquídeas, Micropropagação, Regulador de crescimento.

ABSTRACT

Brassavola tuberculata Hook., better known popularly as "chive" because of its cylindrical or slightly tapered leaf, is a native and epiphytic orchid, which has inflorescences with large numbers of flowers, pleasant scent, long flowering period and flower durability, characterizing High ornamental potential. Another important characteristic of the species is the possibility of crossing with other genera and obtaining new hybrids. Considering the importance of the species, the development of efficient *in vitro* propagation protocols is necessary to guarantee the production of seedlings, either for commercial purposes or for conservation purposes. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* multiplication capacity of *B. tuberculata* using three - leafed nodal explants from microplants previously germinated *in vitro*. In order to reach the proposed objective, the culture in WPM medium supplemented with different types of cytokinins with 5.0 mg L⁻¹ (BAP, 2iP and Zea), with and without the presence of activated charcoal in the concentration of 1.0 g L⁻¹, as well as the performance of *B. tuberculata* cultured in MS and WPM culture media supplemented with different concentrations of BAP (0, 2.5 and 5.0 mg L⁻¹). After 60 days of cultivation, it was concluded that for the *in vitro* multiplication of *Brassavola tuberculata*, the use of BAP associated with 1 g L⁻¹ of activated carbon is recommended for obtaining a greater number of leaves and lengthening of shoots. Regarding the tested concentrations of BAP and culture medium, the results indicate that, in the tested concentrations, the use of 2.5 mg L⁻¹ of BAP in MS medium favors the development of shoots and leaves. The cultivation in WPM medium favors the rooting, damaging the development of the aerial part.

Key words: Orchids, Micropropagation, Growth regulator.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Família Orchidaceae	7
2.2 <i>Brassavola tuberculata</i> Hook.	8
2.3 A importância econômica e ambiental das Orquídeas.....	9
2.3.3 Importância econômica	9
2.3.4 Importância ambiental.....	10
2.4 Micropropagação <i>in vitro</i>	10
2.5 Meio de Cultura	11
2.6 Carvão Ativado	12
2.7 Citocininas	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO.....	23
6 REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

Dentre o grupo de angiospermas, a família Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores, com aproximadamente 880 gêneros e cerca de 27.800 espécies distribuídas em todo o mundo (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2017) e, de acordo com Faria et al., 2010 existem mais de 120.000 híbridos naturais e artificiais. No Brasil já foram descritos 221 gêneros, 2.294 espécies e 10 subespécies (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). Apesar dos inúmeros táxons de orquídeas, de acordo com Swarts e Dixon (2009), a coleta indiscriminada dessas plantas na natureza e a degradação de seu habitat têm levado muitas espécies a serem classificadas como ameaçadas de extinção.

A diversidade, beleza e a constante procura por novas variedades tem agregado um alto valor econômico para os produtores e comerciantes. Na sua grande maioria as orquídeas são comercializadas como flor de corte e plantas de vasos (FARIA e COLOMBO, 2015), no entanto, apresentam potencial alimentício, cosmético, medicinal e são consideradas bioindicadoras do estado de preservação de uma determinada área, indicando a importância do estágio sucessional em que um ambiente se encontra, apenas analisando a densidade de orquídeas presentes na localidade (PELÚZIO e SOARES, 2004).

As orquídeas nativas brasileiras têm despertado grande interesse no mercado de plantas ornamentais, principalmente no que se refere a programas de melhoramento e de reintrodução das espécies em seus habitats (SOARES et al., 2012). Dentre as espécies nativas alvos de programas de melhoramento, podemos citar a *Brassavola tuberculata* Hook. Esta espécie de grande importância comercial devido à capacidade de combinação genética e características morfológicas, vêm sendo utilizada para a criação de híbridos duplos ou triplos, resultado de cruzamentos com os gêneros de orquídeas como *Cattleya*, *Laelia*, *Sophranitis* e *Epidendrum* (SOARES et al., 2012).

A produção de plantas na micropropagação depende de vários fatores, tais como condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida e do meio de cultura apropriado que permite a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias. As necessidades nutricionais para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* varia conforme as espécies, as variedades e mesmo dentro da própria planta, o que torna necessária a otimização dos meios de cultura (SOUZA, 2013).

Além dos nutrientes necessários fornecidos pelos meios de cultura, outros componentes são adicionados para um melhor desempenho *in vitro* das orquídeas, como

exemplo, os reguladores de crescimento e o carvão ativado. Esses elementos podem induzir diferentes respostas em relação ao desenvolvimento das orquídeas, devido as variações genéticas existentes (SANTOS et al., 2007), tornando-se relevante verificar seus efeitos sobre a espécie estudada.

As substâncias reguladoras mais utilizadas são as citocininas, pois ajudam na divisão e diferenciação celular vegetal *in vitro* (CALDAS et al., 1998; TAIZ e ZEIGER, 2009). O carvão ativado por sua vez, é utilizado como estimulante no processo de enraizamento e para a adsorção compostos fenólicos e exudatos de plantas (CALDAS et al., 1998; PAN e STANDEN, 1998).

Sendo assim, o estudo e desenvolvimento de protocolos eficientes para a propagação e conservação das espécies nativas de orquídeas é muito importante. Objetivou-se identificar a condição de cultivo que promova maior crescimento *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. com a utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), Isopenteniladenina (2ip) e Zeatina, associadas ou não com carvão ativado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae pertence à ordem *Asparagales*, e é formada por 27.800 espécie e possui 880 gêneros e 100.000 híbridos, sendo a segunda maior família de flores em todo o mundo e a primeira entre as angiospermas e pode ser encontrada em quase toda a região do planeta, com exceção das regiões polares e nos desertos (MATTIUZ et al., 2006; ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2017). A maioria das espécies são encontradas em florestas tropicais e subtropicais, podendo ser encontrada crescendo diretamente no solo, em pedras ou como epífitas quando o crescimento ocorre em cima de outra planta sendo está o principal modo de crescimento (MATTIUZ et al., 2006; KASULO et al., 2009).

As orquídeas são ervas perenes com elevada diversidade, tanto morfológicas, quanto vegetativa e reprodutiva, e possuem certas peculiaridades florais, que possibilitam a fácil identificação, por possuírem flores de simetria bilateral, com uma das pétalas modificadas e em algumas vezes maior, sendo denominado labelo, e apresenta geralmente um único estame ligado aos estiletos e estigma que forma a coluna ou ginostêmio (JUNCÁ et al., 2005).

As plantas desta família são muito susceptíveis as alterações ambientais, pois as sementes são dispersas pelo vento, e, quando caem em um ambiente não propício podem não germinar, podem tolerar as novas condições ambientais, ou até mesmo podem sofrer mudanças genótípicas para que seja possível a adaptação ao novo ambiente. De acordo com Kumar et al. (2007), estas são algumas das razões que fazem das orquídeas um dos maiores grupos dentre as plantas com flores, podendo ser esta capacidade de adaptação responsável pelo aumento de novas espécies e uma das razões das extinções de algumas espécies.

Apesar do grande número de representantes da família das orquídeas e a ampla dispersão no mundo da mesma, muitas espécies são alvos da destruição dos seus habitats naturais e coleta predatória, em razão do alto valor de mercado, levando conseqüentemente a extinção de muitas espécies de orquídeas (VENDRAME et al., 2014).

2.2 *Brassavola tuberculata* Hook.

Dentro da família Orchidaceae, o gênero *Brassavola* está entre os mais conhecidos no Brasil, pode ser encontrado desde o México até a Argentina (BELLONE, 2006). O gênero é composto por oito espécies e todas são de origem da América tropical, sendo encontrado em áreas conhecidas como *inselbergs*, os quais são caracterizados como relevos residuais, onde ocorrem formações rochosas no meio da paisagem (SANTOS e TEIXEIRA, 2010).

Dentre as espécies conhecidas deste gênero, desta-se a *Brassavola tuberculata* Hook., conhecida popularmente como “cebolinha, rabo de rato, chuva de prata e orquídea dama-da-noite” (RECH et al., 2010), e tem como sinônimo homotípico *Bletia tuberculata* (Hook.) Rchb.f. (BARROS et al., 2015). Soares et al. (2012) afirmam que, pela capacidade de combinação genética e características morfológicas é possível produzir híbridos duplos e triplos com *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronitis* e *Epidendrum*, com elevados valores no mercado interno e externo. O intercruzamento desses gêneros geram híbridos que são mais atrativos em virtude das características morfológicas, do que quando comparados àquelas fornecidas pelos seus progenitores (SOUSA et al., 2015).

A *Brassavola tuberculata* Hook. é uma erva epífita, rupícola (BARROS et al., 2015). A espécie apresenta caule cilíndrico de 3,0 a 9,5 cm de comprimento, com folhas apresentando de 9,5 a 17 cm de comprimento e diâmetro de 0,2 a 0,4 cm, a inflorescência é terminal, tipo racemo, e as flores ressupinadas, não calcaradas (PESSOA e ALVES, 2014). A inflorescência pode apresentar de cinco a sete flores, longo período de floração e durabilidade das mesmas, exalando perfume agradável e a sua coloração é branca levemente amarelada (RECH et al., 2010).

No Brasil, de acordo com Barros et al., (2015), a espécie é nativa, não endêmica, podendo ser encontrada na regiões Norte (no Estado de Tocantins); Nordeste (nos Estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (nos Estados de Goiás, Mato Grosso e segundo Rech et al. (2010; 2011) no Mato Grosso do Sul), Sudeste (nos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), ocorrendo nos Biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, em Vegetação do tipo Cerrado (*lato sensu*), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), Restinga e vegetação sobre afloramentos rochosos.

2.3 A importância econômica e ambiental das Orquídeas

2.3.3 Importância econômica

As orquídeas são principalmente conhecidas por sua beleza em razão das suas flores, que permite a elas possuírem grande importância econômica no mercado de floricultura/plantas ornamentais e na indústria de alimentos. Uma das principais características das orquídeas são suas flores exuberantes e a cor que as mesmas possui, essas qualidades permitem que muitas espécies sejam comercializadas por alto valor comercial em países como a Tanzânia e África do Sul (KASULO et al., 2009).

No Brasil a importância econômica das plantas ornamentais está crescendo ao longo dos anos, porém o consumo per capita de plantas ornamentais no mercado brasileiro ainda é considerado baixo em comparação aos países desenvolvidos (JUNQUEIRA e SILVA, 2008). Esse crescimento está associado as melhorias das técnicas de propagação *in vitro* e multiplicação que possibilitam maior competitividade e variabilidade dentro do mercado de plantas ornamentais aumentando assim a comercialização das orquídeas (STANCATO et al., 2001).

Considerando a importância das orquídeas, seja para fins comerciais, reintrodução de espécies em áreas degradadas ou para a recuperação de espécies em risco de extinção, a produção de mudas é um objetivo constante a ser atingido. A domesticação de espécies selvagens e a reprodução tradicional representam o principal caminho para a geração de novas flores na indústria. No entanto, muitas variedades perderam o seu aroma em meio aos cruzamentos realizados nos programas de melhoramento genético. Produtores de orquídeas se concentram em oferecer para o mercado, flores com melhores características de transporte, estética visual e vida de vaso (HISAO et al., 2011).

2.3.4 Importância ambiental

De acordo com Hernández (2013) as orquídeas oferecem abrigo para muitos animais, fungos e bactérias; néctar para as abelhas, moscas, borboletas, mariposas e beija-flores, em troca de serviços de polinização fornecidos por esses agentes.

Muitas espécies de orquídeas são consideradas bioindicadoras do estado de preservação de uma determinada área, indicando a importância do estágio sucessional em que um ambiente se encontra (PELÚZIO e SOARES, 2004).

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de gemas adventícias ou laterais (brotações) ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. Um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas (RAMOS e CARNEIRO, 2007).

A sobrevivência dessas plantas na natureza depende da interação entre fatores bióticos e abióticos, pois, estes fatores atuam na regulação do crescimento, desenvolvimento e na reprodução das plantas. Entretanto, ações antropogênicas ameaçam a ocorrência natural dessas espécies (SWARTS e DIXON, 2009).

2.4 Micropropagação *in vitro*

A micropropagação tem sido o método mais utilizado para a produção de orquídeas em larga escala pelos produtores, auxiliando assim na preservação destas espécies, tendo como uma de suas principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas (FARIA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; UNEMOTO et al., 2007).

Durante os últimos 45 anos, a técnica de cultura de tecido tem sido aprimorada para a exploração em larga escala da propagação de orquídeas e sua preservação *ex situ*. O avanço na técnica de cultura de tecidos proporcionou o desenvolvimento de diferentes protocolos para a propagação de espécies de orquídeas através da cultura *in vitro* de várias partes da planta como raízes, segmentos de rizoma, nódulos de flor e gemas (CHUGH et al., 2009).

Considerada uma das ferramentas mais utilizadas dentro da cultura de tecidos, a micropropagação, tem sido empregada como uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico como as medicinais e multiplicação de orquídeas (CARVALHO et al., 2006; MORAIS et al., 2012). Essa técnica é considerada o método mais viável para a produção de mudas com elevada qualidade além de obter elevado número de

exemplares em tempo e espaço reduzido e em qualquer período do ano sem a necessidade de depender das condições climáticas (BOSA et al., 2003).

O cultivo *in vitro* através da micropropagação é uma alternativa para a propagação de diversas espécies, podendo ser utilizada também com as espécies nativas (SOUZA et al., 2007). Em comparação às técnicas de propagação tradicional (estaquia, enxertia, mergulhia etc), a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de multiplicação das mais variadas espécies de plantas, com segregação genética reduzida (MORAES et al., 2010), grandes quantidades de mudas uniformes (FIGUEIREDO et al., 2007), produção em larga escala e em períodos de tempo pequenos (ARRIGONI-BLANK et al., 2011), e obtenção de maneira rápida e em espaço físico reduzido, com qualidade fitossanitária, superando os limites ambientais (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998), sendo uma alternativa eficiente para propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI e SCHUCH, 2008).

2.5 Meio de Cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Eles se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*, e complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; UNEMOTO et al., 2007).

As variações existentes nos meios de cultivo na micropropagação estão relacionadas com os micronutrientes e nos fito-hormônios. Para escolher o melhor meio depende qual a finalidade do estudo (meristema, organogênese, embriogênese somática, cultivo de explantes) e a espécie utilizada (HOFFMANN et al., 1998).

Composto por elementos essenciais, água, vitaminas, açúcares, reguladores de crescimento, ágar (GEORGE e SHERRINGTON, 1984) e alguns aditivos como carvão ativado, antibióticos e outras misturas complexas extrato de levedura, água de coco, polpa de banana, fertilizantes minerais (PASQUAL et al., 1998; SU et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012)

Segundo Hoffmann et al. (1998), a redução das concentrações de sais nos meios de cultura, promove o melhor crescimento de tecidos em orquídeas. Assim a determinação da

concentração ideal do meio MS, para cada espécie, potencializa o seu crescimento (PASQUAL et al., 2001).

Na micropropagação o meio MS é o mais utilizado, com elevada proporção de nitrogênio (N) na forma nitrato de amônio (NO_3NH_4^+ = 66,34) sendo maior do que na maioria dos outros meios, podendo assim ser modificado. Meios com menor proporção de nitrogênio como Knudson, White ou (LLOYD e MCCOWN, 1980) WPM, são mais apontados para melhorar o crescimento e a morfogênese em algumas espécies de orquídeas (HOFFMANN et al., 1998; PASQUAL et al., 2001).

2.6 Carvão Ativado

O uso do carvão ativado em meio de cultura pode beneficiar o desenvolvimento e crescimento do tecido, porém o oposto também pode ocorrer dependendo do tipo de meio empregado ou tecido utilizado (VAN WINKLE et al., 2003). Durante a técnica de micropropagação é comum ocorrer a oxidação por causa dos fenóis liberados pelos explantes e esse processo influencia diretamente no resultado final. Para minimizar essa oxidação utiliza-se agentes antioxidantes como o carvão ativado e vitamina C no próprio meio de cultura (PAN e STADEN, 1998).

O carvão ativado tem a propriedade de adsorver vários tipos de moléculas, podendo ser gasosas ou líquidas e ao longo dos anos o carvão ativado é utilizado na cultura de tecidos para o crescimento e desenvolvimento das células vegetais, porém devido à atividade do carvão em adsorver moléculas do meio, ele acaba removendo as atividades de certos hormônios como as auxinas e citocininas do meio de cultura (WEATHERHEAD et al., 1978).

2.7 Citocininas

A interação e balanço dos reguladores de crescimento - principalmente auxinas e citocininas- existentes no meio de cultura, podem determinar o crescimento e o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Diferentes espécies de orquídeas podem se desenvolver de maneira distinta quando cultivadas no mesmo meio de cultura, indicando que cada espécie tem uma concentração adequada de reguladores de crescimento para a morfogênese e crescimento *in vitro* (ARAÚJO et al., 1999; GEORGE e SHERRINGTON, 1984; SOARES et al., 2009).

As citocininas são substâncias com propriedades de promover a divisão celular ou citocinese. No cultivo e desenvolvimento de plântulas *in vitro* são essenciais, atuando na regeneração de calos, na indução de brotos ou na multiplicação de gemas axilares e apicais de

plantas lenhosas ou herbáceas, bem como na superação da dormência apical (THORPE et al., 1984; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; TAIZ e ZEIGER, 2009; CAMBORG, 2012).

Os reguladores de crescimento mais utilizados, dentro da classe das citocininas em cultura de tecidos são: Cinetina, 6-benzilaminopurina (BAP), Zeatina e 2-isopenteniladenina (2iP), com concentrações de uso podendo variar de 0,03 a 30 mg L⁻¹ (CARVALHO, 1999; TORRES e BARBOSA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS. O material vegetal utilizado consistiu de explantes caulinares nodais, com três gemas laterais e $\frac{3}{4}$ das respectivas lâminas foliares de *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae). As microplantas utilizadas foram previamente germinadas *in vitro*, no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias e, posteriormente, cultivadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Para atingir os objetivos propostos avaliou-se em dois experimentos distintos, o efeito de diferentes citocininas (6-benzilaminopurina - BAP, 2-isopenteniladenina - 2iP e Zeatina - Zea), o efeito do carvão ativado (presença e ausência), do meio de cultura (WPM -LLOYD e MCCOWN, 1980 e MS - MURASHIGE e SKOOG, 1962) e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a multiplicação *in vitro*. Ambos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e para cada experimento foram realizadas quatro repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo, contendo cinco explantes cada.

No primeiro experimento avaliou-se o efeito de 5,0 mg L⁻¹ das citocininas, BAP, 2iP e Zea, adicionadas ao meio de cultura WPM, com e sem adição de carvão ativado na concentração de 1 g L⁻¹. O experimento foi composto de oito tratamentos: WPM sem carvão ativo e sem citocininas (tratamento controle), WPM + carvão ativado, WPM + Zea, WPM + Zea + carvão ativado, WPM + BAP, WPM + BAP + carvão ativado, WPM + 2iP e WPM + 2iP + de carvão ativado. No segundo experimento foram testados duas formulações de meios de cultura MS e WPM e três concentrações de BAP 0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, totalizando seis tratamentos.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro transparente (250 mL), contendo 30 mL de meio de cultura, vedados com tampa de rosca plástica. O meio de cultura utilizado

foi preparado previamente de acordo com o tratamento, acrescido de 100 mg L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, sendo este último adicionado após o pH ser ajustado para 5,8. Após a homogeneização do meio em forno de micro-ondas, as alíquotas de meio foram distribuídas nos frascos de cultivo e estes foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios, procedeu-se com a preparação e inoculação dos explantes nos frascos de cultura, sendo estes transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Nos dois experimentos, aos 60 dias de cultivo foram avaliados o número de folhas, de brotações e de raízes, e o comprimento das brotações e raízes (cm). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas por regressão polinomial e/ou pelo teste de Duncan (P<0,05), com o uso do programa estatístico Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2002). Os dados obtidos em número foram transformados em raiz quadrada de (x + 0,5).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à interação dos fatores estudados, tipo de citocinina x carvão ativado, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as variáveis analisadas. Quanto ao efeito de diferentes citocininas e do carvão ativado na multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook., de acordo com a análise de variância verificou-se diferenças estatísticas significativas do tipo de citocinina utilizada sobre número médio de brotações e comprimento médio das brotações (cm) a 5% de probabilidade de erro. Com relação à presença e/ ou ausência de carvão ativado foi verificado um efeito deste fator, a 5% de significância, sobre o número médio de raízes (tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para as variáveis: número de folhas, número de brotações, comprimento das brotações (cm), número de raízes e comprimento das raízes (cm) na multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. cultivada com diferentes tipos de citocininas e na presença ou ausência de carvão ativado. GL = graus de liberdade; C.V. = coeficiente de variação. UFGD, Dourados- MS, 2017.

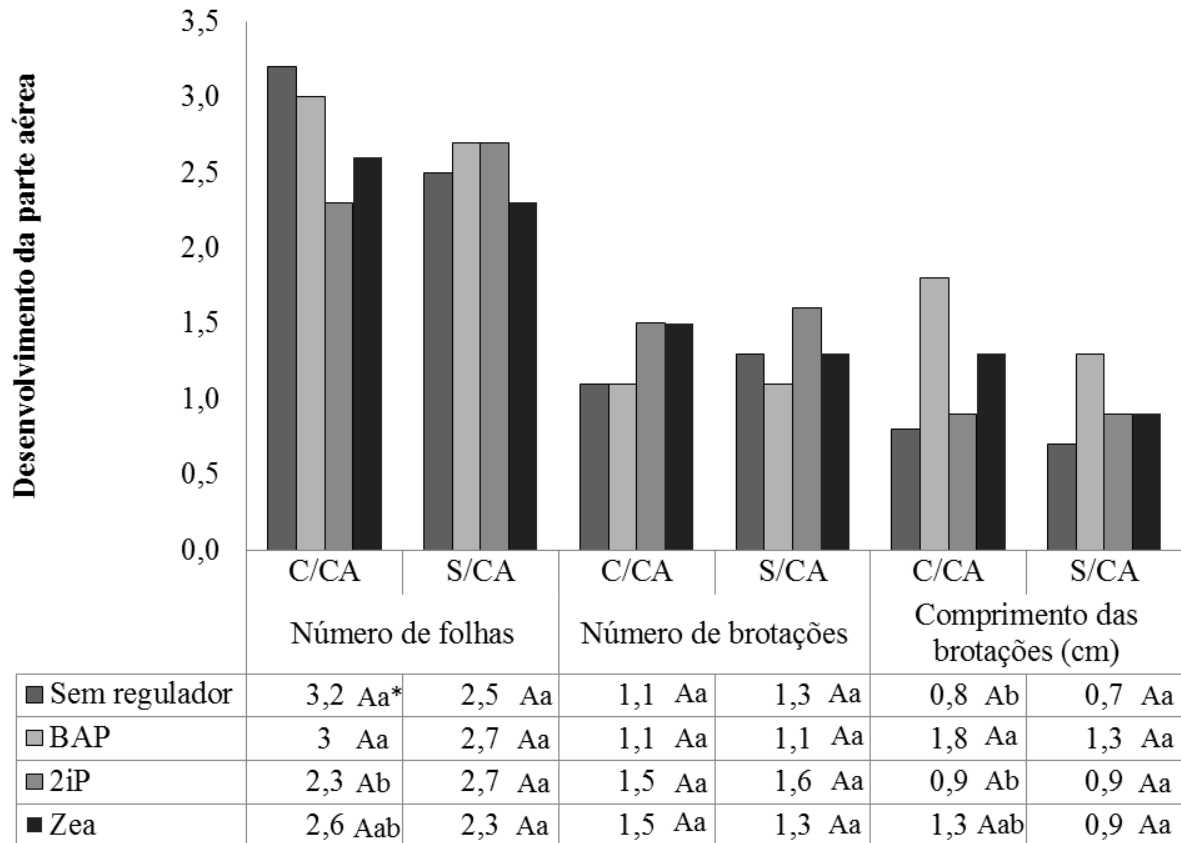
Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		Número de folhas	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Tipo de citocinina	3	0,03582 ^{ns}	0,04745*	0,99323*	0,06734 ^{ns}	0,44807 ^{ns}
Carvão ativado	1	0,01033 ^{ns}	0,00174 ^{ns}	0,60390 ^{ns}	0,27024*	0,03194 ^{ns}
Tipo de citocinina. x Carvão ativado	3	0,06524 ^{ns}	0,01504 ^{ns}	0,07412 ^{ns}	0,07141 ^{ns}	0,18722 ^{ns}
Resíduo	24	0,02555	0,01511	0,21816	0,05358	0,23465
C.V. (%)		9,00	9,16	42,66	15,92	59,14
Média Geral		1,77	1,34	1,09	1,45	0,81

Fonte: Autora

* e ns, significativos a 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Quanto ao desenvolvimento da parte aérea não foram observados efeitos significativos para o número médio de brotações quando os explantes foram cultivados em meio suplementado com carvão ativado, independentemente da citocinina utilizada (figura 1). Entretanto, os diferentes tipos de citocininas testados demonstraram um efeito significativo na média geral de brotações obtidas, com valor de 1,3 (valor não tabulado). O número médio de folhas observado foi superior em explantes cultivados no tratamento sem a adição de citocinina (3,2 folhas) e no meio suplementado com BAP (3,0 folhas), no entanto para esta variável a presença de carvão ativado não exerceu influência (figura 1). Já para o comprimento médio das brotações (cm) observou-se que explantes cultivados em meio suplementado com BAP apresentam maiores valores na presença de carvão ativado, sendo superior de explantes cultivados em meio sem regulador e/ou 2iP (figura 1).

Figura 1: Desenvolvimento da parte aérea aos 60 dias de multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. no meio de cultura WPM, em função de diferentes citocininas, com e sem adição de carvão ativado. UFGD, Dourados- MS, 2017.



Fonte: Autora

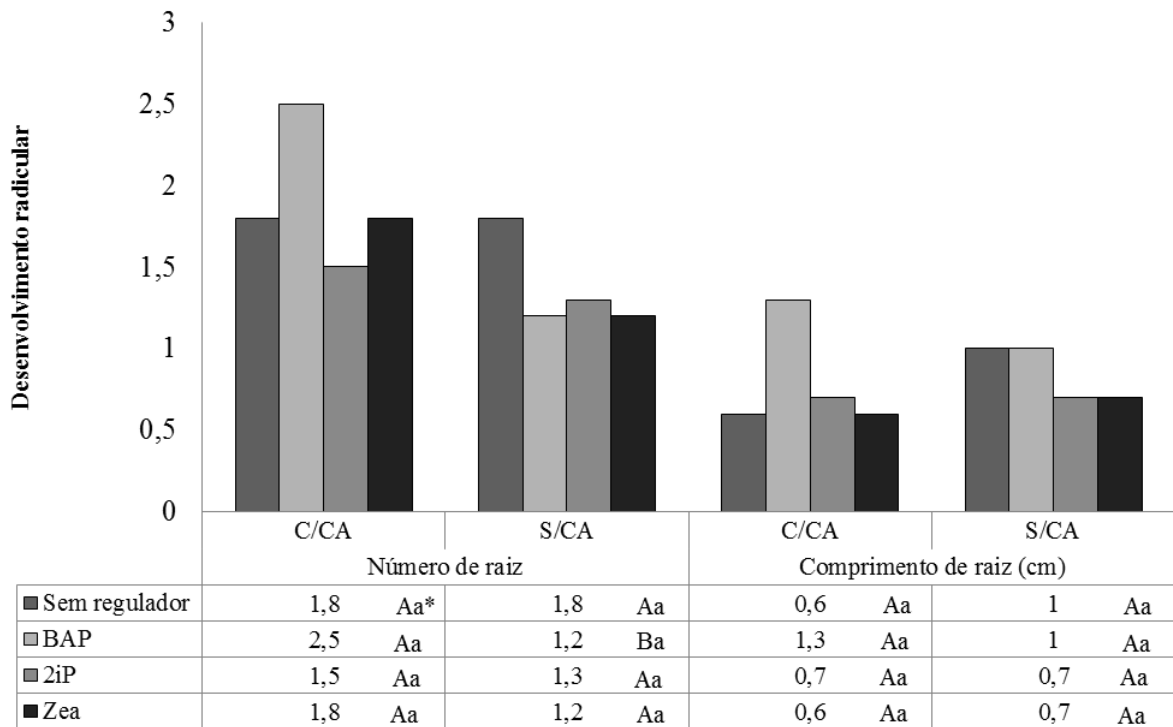
*Medidas seguidas por letra iguais maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Com relação à interação carvão ativado x tipo de citocinina, Villa e seus colaboradores (2014), também não encontraram efeito significativo na multiplicação *in vitro* de híbridos de orquídeas. Soares et al, (2012), observaram o favorecimento no crescimento das brotações com o carvão ativado em *B. tuberculata*, utilizando 4,33 g L⁻¹ de carvão ativado. Schneiders et al., (2012) verificaram que a melhor concentração para a altura das plantas de *Cattleya harrisoniana* foi de 2,5 g L⁻¹ com uma média de 6,62 cm. Em *Catasetum fimbriatum*, Morales et al., (2006) observaram maior desenvolvimento da parte aérea na concentração de 5 g L⁻¹ de carvão ativado.

Quanto ao desenvolvimento radicular de *B. tuberculata*, neste experimento, o uso de BAP aliado a suplementação com carvão ativado promoveu um aumento do número médio de raízes, no entanto, este mesmo tratamento não exerceu influência sobre o comprimento médio

das raízes de acordo com a estatística, mas a maior média foi obtida com esse tratamento (2,5 raízes) (figura 2).

Figura 2: Desenvolvimento radicular aos 60 dias de multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. no meio de cultura WPM, em função de diferentes citocininas, com e sem adição de carvão ativado. UFGD, Dourados- MS, 2017.



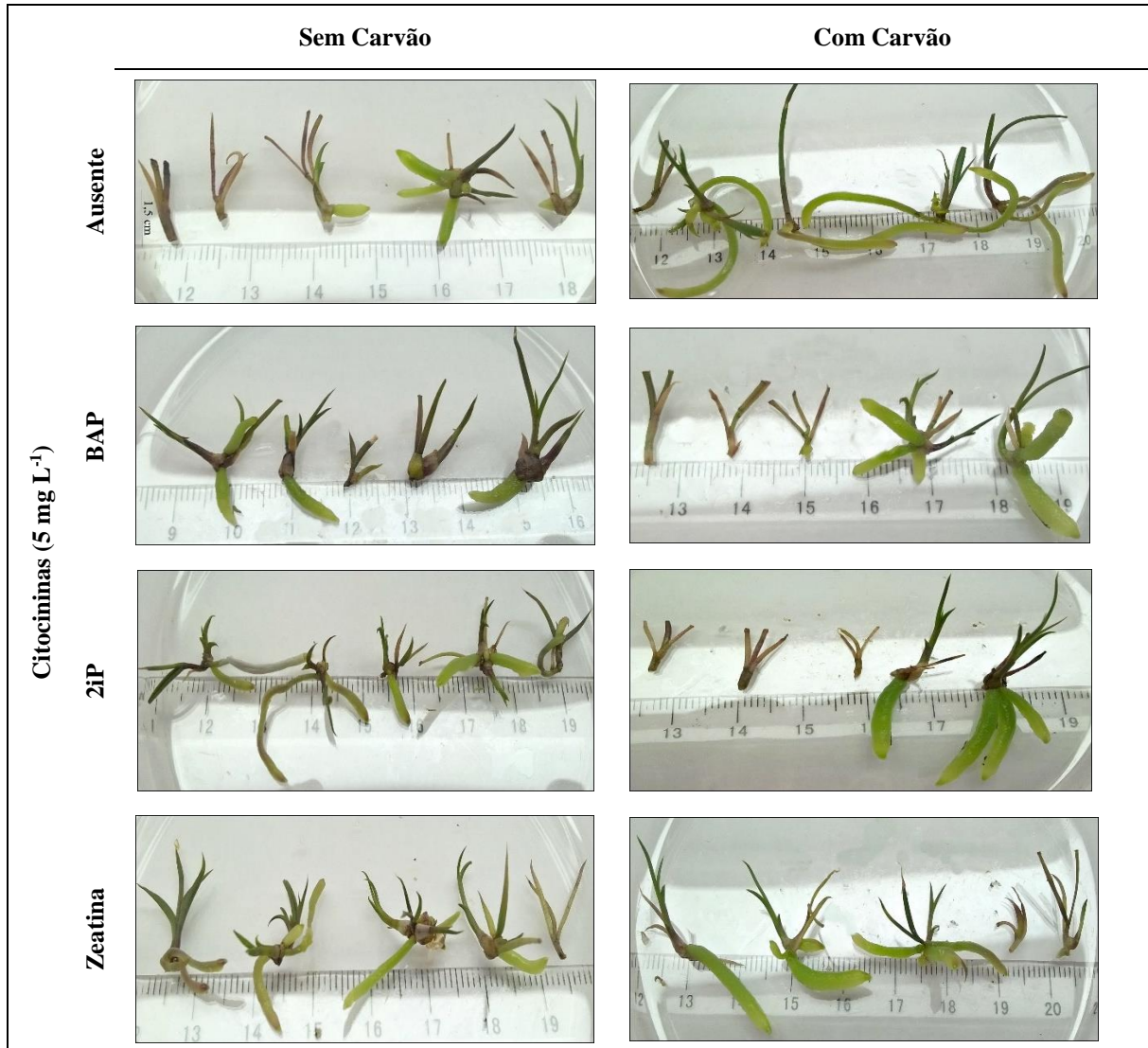
Fonte: Autora

*Medidas seguidas por letra iguais maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

No crescimento *in vitro* de *Cattleya harrisoniana*, Schneiders e colaboradores (2012), obtiveram resultados significativos para número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz, 6,09 e 3,89 cm, respectivamente, com adição de 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura.

Quanto a aspecto visual geral das microplantas de *B. tuberculata* cultivadas em meio com diferentes citocininas, com e sem adição de carvão ativado (figura 3), foi possível observar que houve maior alongamento das raízes e maior espessamento na presença de carvão ativado, porém, com redução do número de brotações. Os explantes cultivados em meio sem a suplementação com carvão ativado apresentaram maior número de raiz, no entanto observou-se um incremento no comprimento das brotações, as quais apresentam menores valores de altura.

Figura 3: Aspecto visual das microplantas de *Brassavola tuberculata* Hook. após 60 dias de multiplicação *in vitro* no meio de cultura WPM, em função de diferentes citocininas, com e sem adição de carvão ativado. UFGD, Dourados- MS, 2017.



Fonte: Autora

Quanto a interação dos fatores estudados, meio de cultura x concentração de BAP, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as variáveis analisadas. Quanto ao efeito de diferentes meios de cultura e concentração de BAP na multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook., de acordo com a análise de variância verificou-se diferenças estatísticas significativas do meio de cultivo sobre o comprimento médio das brotações (cm), o número médio de raízes e comprimento médio das raízes (cm) a 1% de probabilidade de erro, evidenciando que o meio de cultura exerce influência sobre estas variáveis. Com relação ao uso do BAP em diferentes concentrações foi verificado um efeito isolado deste fator, a 5% de significância, sobre o comprimento médio das raízes (cm) (tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis: número de folhas, número de brotações, comprimento das brotações (cm), número de raízes e comprimento das raízes (cm) na multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. cultivada com diferentes tipos de meio de cultura e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. GL = graus de liberdade; C.V. = coeficiente de variação. UFGD, Dourados-MS, 2017.

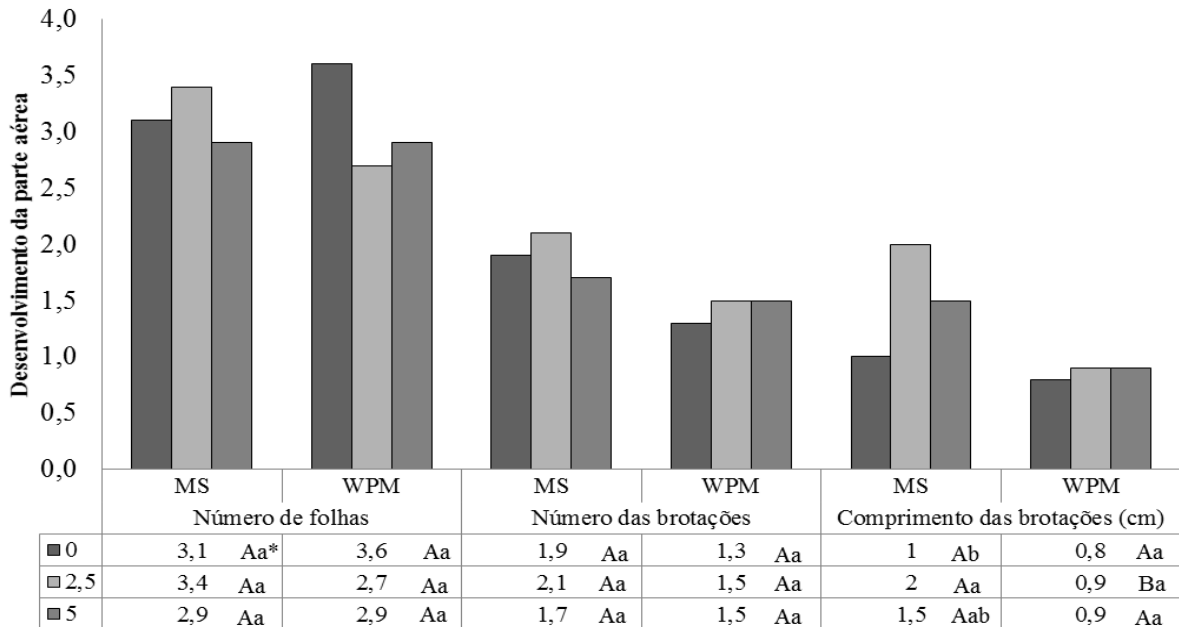
Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		Número de folhas	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Concentração de BAP	2	0,02372 ^{ns}	0,009071 ^{ns}	0,40649 ^{ns}	0,09036 ^{ns}	0,38112*
Meio de cultura	1	0,00229 ^{ns}	0,11871 ^{ns}	1,91318**	0,36075**	1,78074**
Concentração de BAP x meio de cultura	2	0,04955 ^{ns}	0,01402 ^{ns}	0,47856 ^{ns}	0,04169 ^{ns}	0,06989 ^{ns}
Resíduo	14	0,03704	0,04028	0,16418	0,03557	0,06903
C.V. (%)		10,18	13,73	35,43	14,15	45,30
Média Geral		1,89	1,46	1,14	1,33	0,58

Fonte: Autora

**, * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Com relação ao desenvolvimento da parte aérea verificou-se influência significativa do meio de cultivo MS, suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de BAP sobre o desenvolvimento dos explantes, os quais apresentaram maiores brotações (2 cm) que explantes cultivados em meio WPM na mesma concentração de BAP (0,9 cm). Para o número médio de folhas e número médio das brotações não foram observadas diferenças significativas nos explantes cultivados nos diferentes meios de cultivo (Figura 4).

Figura 4. Desenvolvimento da parte aérea aos 60 dias de multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do tipo de meio de cultura e da concentração de BAP no meio de cultura. UFGD, Dourados- MS, 2017.



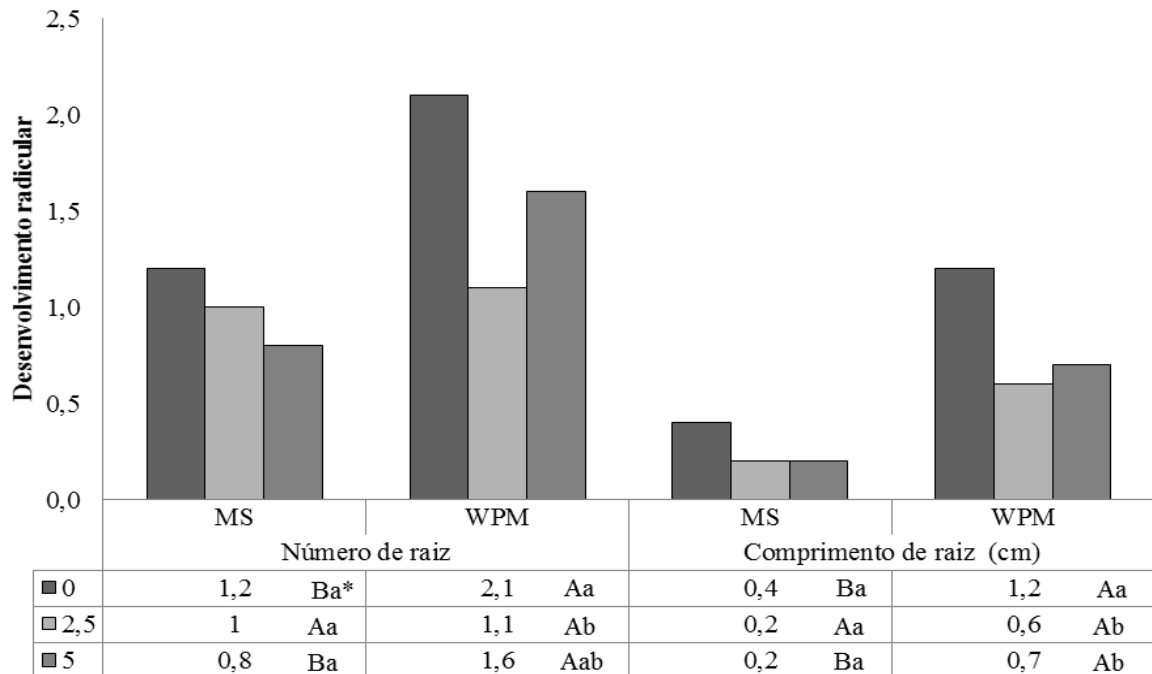
Fonte: Autora

*Medidas seguidas por letra iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

O meio MS foi favorável para o crescimento dos brotos, assim como no estudo de Miyata et al. (2014), onde os autores avaliaram diferentes meios de cultura para híbridos de orquídeas e observaram que o meio de cultura MS se sobressaiu em relação aos demais (DSD1; Knudson, B5 e WPM) no cultivo *in vitro* de *Brassolaeliocattleya* George King Serenity x *Brassolaeliocattleya* Vallezac Magic Fire (BCL).

Quanto ao desenvolvimento radicular, foi possível observar um efeito significativo do meio de cultivo WPM, tanto para o número médio de raiz, quanto para o comprimento médio da raiz na ausência do regulador (figura 5). O aumento do número de raízes nos explantes cultivados na ausência de BAP pode ser justificado pelo fato de que, na ausência deste regulador, considerando seu conhecido efeito sobre o estímulo do desenvolvimento das brotações, na sua ausência, há uma redução na competição por fotoassimilados e nutrientes que seriam deslocados para o crescimento da parte aérea. Ao ser alterado este dreno, provavelmente ocorre um investimento no desenvolvimento do sistema radicular.

Figura 5. Desenvolvimento radicular aos 60 dias de multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do tipo de meio de cultura e da concentração de BAP no meio de cultura. UFGD, Dourados- MS, 2017.

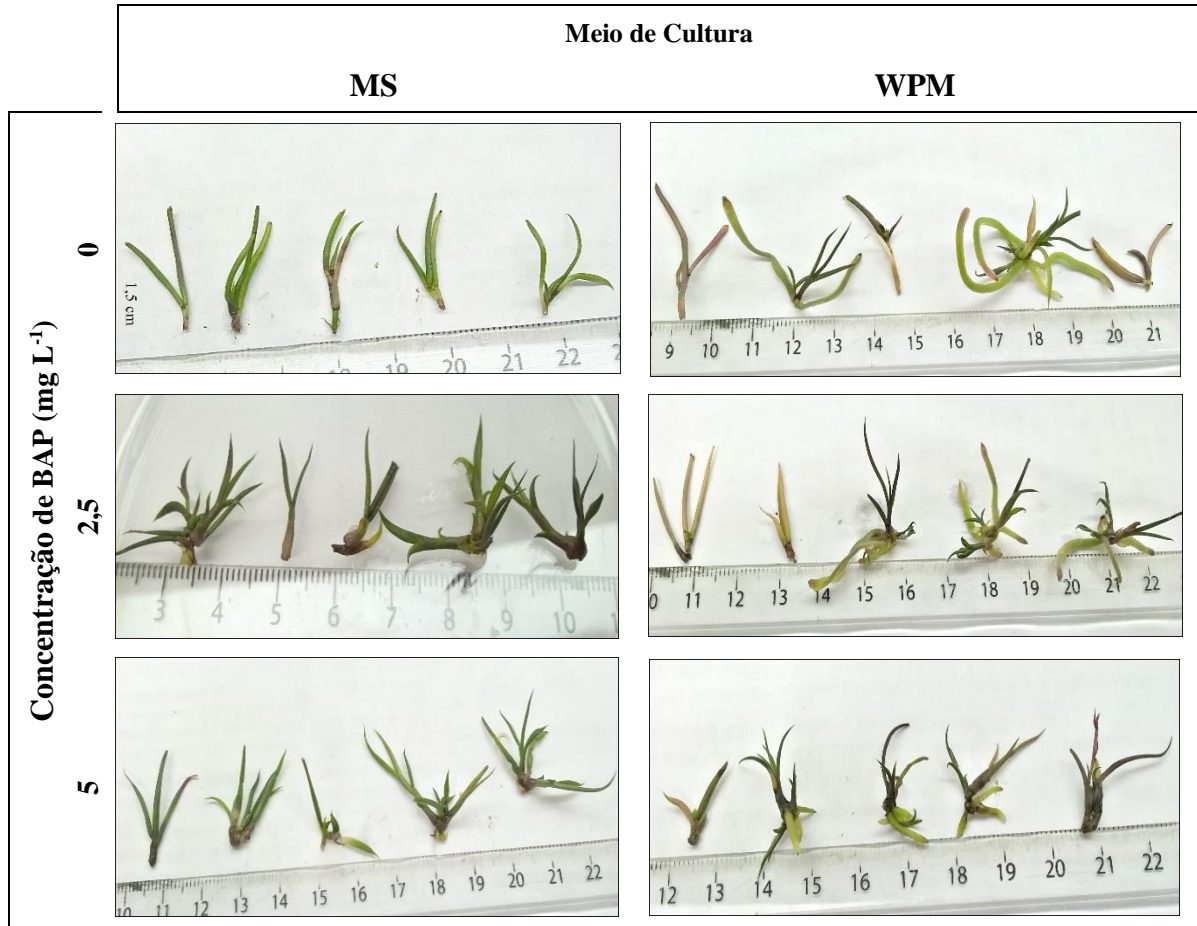


Fonte: Autora

*Medidas seguidas por letra iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Com relação ao aspecto visual dos explantes de *B. tuberculata* em função do tipo de meio de cultura e da concentração de BAP (figura 6) foi possível observar que os explantes cultivados em meio MS com adição de 2,5 mg L⁻¹ de BAP são mais vigorosas e provavelmente apresentam maior teor de clorofila com base na coloração exibida. Explantes cultivados em meio WPM desenvolveram raízes em maior número e bastante espessas, o que provavelmente reduziu o desenvolvimento da parte aérea.

Figura 6: Aspecto visual das microplantas de *Brassavola tuberculata* Hook. após 60 dias de multiplicação *in vitro*, em função do tipo de meio de cultura e da concentração de BAP. UFGD, Dourados- MS, 2017.



Fonte: Autora

Uma característica observada na *B. tuberculata* foi a emissão das novas brotações na base do explante, sendo semelhante ao perfilhamento como em espécies de trigo (*Triticum* spp), cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e entre outras. Na literatura relatada, os autores atribuem o perfilhamento ou produção de protocormóides de orquídeas à adição de auxina combinada ou não com citocinina em meio de cultivo (PANT e PRADHAN, 2010; PANT e SWAR, 2011; ASGUAR et al., 2011; ARENMONGLA e DEB, 2012), entretanto no presente trabalho o perfilhamento também foi observado sem a utilização de fitorreguladores.

5 CONCLUSÃO

Na multiplicação *in vitro* de *Brassavola tuberculata*, é possível dizer que a obtenção de maior número de folhas e alongamento das brotações é devido ao uso de BAP associado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado.

Quanto às concentrações testadas de BAP e meio de cultura, os resultados indicam que, nas concentrações testadas o uso de 2,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS, favorece o desenvolvimento das brotações e de folhas. O cultivo em meio WPM favorece o enraizamento, prejudicando o desenvolvimento da parte aérea.

6 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L. G.; CARNEIRO, L. F.; PRABHU, A. S. Produção *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 20, n. 2, p. 67-71, 1999.
- ARENMONGLA, T.; DEB, C. R. Germination of immature embryos and multiplication of *Malaxis acuminata* D. Don, an endangered therapeutically important orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. **Indian Journal of Biotechnology**, Nagaland, v. 11, n. 4, p. 464-469, 2012.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, A. V.; BLANK, A. F. Organogênese direta e aclimatização de plantas de patchouli. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 29, n.2, p. 145-150, 2011.
- ASGHAR, S.; AHMAD, T; HAFIZ, I. A; YASEEN, M. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n.16, p. 3097-3103, 2011.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI N. 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. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11230>>. Acesso em: 03 de jan. 2017.
- BELLONE, R. **Orquídeas: Guía del aficionado**. Ediciones Omega. Barcelona. 544 p, 2006.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.207-210, 2003.
- 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-Serviço de Produção de Informação/EMBRAPA-CNPq, v. 1, p.87-132, 1998.

CAMBORG, O. L. Plant cell culture: nutrition and media. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, v. 1, p. 18-26, 2012.

CARVALHO, J. M. F. C. Técnicas de micropropagação. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 39. (Documentos, 64), 1999.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. Fatores inerentes à micropropagação. **Embrapa Algodão. Documentos**, 2006.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. Usha Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 482-487, 2008.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. List of plants in the family Orchidaceae. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Orchidaceae-2075389>>. Acesso em: 03 de mar. 2017.

FARIA, R. T.; COLOMBO, R. C. *Oncidium*: a orquídea em expansão no cenário florícola. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, v. 33, n. 4, p. 533, 2015. Disponível em: <<http://S0102053620150004005lng=en&nrm=iso>>. Acesso em 23 jan. 2017.

FARIA, R.T.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO, L.K.; SILVA, G.L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.28, n.1, p.71-74, 2006.

FIGUEIREDO, M. A.; SANTOS, F. M.; COSTA E SILVA, J. O.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 294-296, 2007.

GEORGE, E. F; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by Tissue Culture: handbook and directory of commercial laboratories.** British Library, Great Britain, p. 709. 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-260, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CNPq, p. 99-169, 1990.

HERNÁNDEZ, I. **La importancia de las Orquídeas en el Medio Ambiente: D.** Proyecto GM México, 2013. Disponível em: <<http://proyectogmmexico.blogspot.com.br/2013/02/la-importancia-de-las-orquideas-en-el-d.html>>. Acesso em: 19/03/2017.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos - Tecnologia e aplicações: aplicações na propagação de plantas.** Lavras: UFLA/FAEPE, p. 130, 1998.

HSIAO, Y.Y.; PAN, Z.J.; HSU, C.C.; YANG, Y.P.; HSU, Y.C.; CHUANG, Y.C.; SHIH, H.H.; CHEN, W.H.; TSAI, W.C.; CHEN, H.H. Research on Orchid Biology and Biotechnology. **Plant & Cell Physiology**. v.52, n.9, p.1467-1486, 2011.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Flora do Brasil 2020 em construção. 2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

JUNCÁ, F. A.; FUNCH, L.S., ROCHA, W. Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. **Série biodiversidade**, v. p. 95-223, 2005.

JUNQUEIRA, A. H.; SILVA P. M. da. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio-econômica recente. **Ornamental Horticulture**, v. 14, n. 1, 2008.

KASULO, V.; MWABUMBA, L.; CRY, MUNTHALI. A review of edible orchids in Malawi. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 1, p. 133-139, n. 7, 2009.

KUMAR, PANKAJ; JALAL, JEEWAN SINGH; RAWAT, GOPAL SINGH. Orchidaceae, Chotanagpur, state of Jharkhand, India. **Check List**, v. 3, n. 4, p. 297-304, 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A.R. Programa estatístico **WinStat - Sistema de Análise Estatístico para Windows**. Versão 2.0. Pelotas, 2002.

MATTIUZ, C. F M.; RODRIGUES, T. J. D.; MATTIUZ, BEN-HUR. Aspectos Fisiológicos de Orquídeas Cortadas. **Ornamental Horticulture**, v. 12, n. 1, 2006.

MIYATA, L. Y.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Culture media used in the micropropagation of orchids hybrids. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1731-1737, 2014.

MORAES, C. F.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A.; GRANDO, M. F.; MANTO-VANI, N.; CALVETE, E. O.; DONIDA, B. T. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 1, p. 64-89, 2010.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. Effect of activated charcoal for seedling development of *Catasetum fimbriatum* Lindley (Orchidaceae). **Journal of Plant Science**, v.1, n.4, p.388-391, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

ORCHIDACEAE in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 19 Mar. 2017.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in in vitro culture - A review. **Plant growth regulation**, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.

PANT, B.; PRADHAN, S. Micropropagation of *Cymbidium elegans* Lindl. through protocorm and shoot tip culture. In: **Proc. Sixth Intl. Plant Tissue Cult. & Biotech. Conf.**, December, p. 3-5, 2010.

PANT, B.; SWAR, S. Micropropagation of *Cymbidium iridoides*. **Nepal Journal of Science and Technology**, Kathmandu, v. 12, p. 91-96, 2011.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A. CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações** - meios de cultura. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 2001.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações** - introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 159, 1998.

PELÚZIO, L.E.; SOARES, M.N. Orquídeas: Porta aberta para a educação ambiental. **Revista Ponto de Vista**, Viçosa, v.1, n.1, p.55-63, 2004.

PESSOA, E.; ALVES, M. Orchidaceae em afloramentos rochosos do estado de Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 3, p. 717-734, Sept. 2014 . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201465311>>. Acesso em 18 Mar. 2017.

RAMOS, T.V.; CARNEIRO, I.F. Multiplicação “in vitro” de *Cattleya x mesquiae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.37, p.10-15, 2007.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; MANENTE-BALESTIERI, F. C. de L. Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb.f. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 335-341, 2010.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F. V.; ALVAREZ, V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; ALBUQUERQUE V. E. M. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, p. 9-15, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000100002>>. Acesso em: 07 de fev. 2017.

SANTOS, M. N.; TEIXEIRA, M. L. F. Semente de amendoeira (*Terminalia catappa* L.) (Combretaceae) como substrato para o cultivo de orquídeas epífitas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 339-343, 2010.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59 n.2, p. 185-19, 2012.

SOARES, J. D. R.; ARAÍJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ASSIS, A. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 772-777, 2009.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 33, n. 2, p. 208-215, 2015. Disponível <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200012>>. Acesso em 05 dez. 2016.

SOUZA, E. T. S. Multiplicação *in vitro* de mogno (*Khaya senegalensis*). Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal de Lavras**, Lavras, MG, 2013.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; SOARES, G. C.; Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

STANCATO, G. C.; CESARINO, F. Longevidade e durabilidade de flores de *Laelia purpurata* Lindl.(Orchidaceae). **Ornamental Horticulture**, v. 6, n. 1, 2001.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, Jaboticabal, v. 40, n. 1, p. 28-34, 2012.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 820, 2009.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R.; VASIL, I. Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**, v. 1, 1984.

TORRES, T. A.; BARBOSA, N. V. R. Condições de incubação para cultura *in vitro*. **Revista ABCTP Notícias**, Recife, p. 1-7, 2001.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras e meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.2, p.267-269, 2007.

VAN WINKLE, S. C.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. **Plant cell reports**, v. 21, n. 12, p. 1175-1182, 2003.

VENDRAME, W., FARIA, R. T. D., SORACE, M., SAHYUN, S. A. Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n.3, p. 213-229, 2014.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagation of orchid hybrids in Knudson culture medium with addition of vitamins of MS culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n.2, p. 683-694, 2014.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 89, n. 2, p. 141-147, 1978.