

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Brassavola cebolleta Rchb.F. (ORCHIDACEAE)**

MARIANA BENTO TATARA

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2010

**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Brassavola*
cebolleta Rchb.F. (ORCHIDACEAE)**

MARIANA BENTO TATARA
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: PROF.^a DR.^a. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2010

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

584.15016 T216e	Tatara, Mariana Bento Efeito de reguladores de crescimento na germinação e crescimento <i>in vitro</i> de <i>Brassavola cebolleta</i> Rchb. F. (Orchidaceae). / Mariana Bento Tatara. – Dourados, MS : UFGD : 2010. 26f. Orientadora: Prof ^a . Dr ^a . Yara Brito Chaim Jardim Rosa Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Orquídea – Germinação e crescimento. 2 Orquídea – Reguladores. 3. Plantas – Crescimento. 4. Fisiologia vegetal. I. Título
--------------------	--

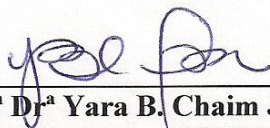
**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA GERMINAÇÃO E
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Brassavola cebolleta* Rchb.F. (ORCHIDACEAE)**

por

Mariana Bento Tatará

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

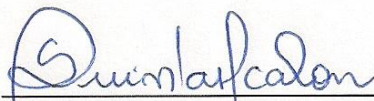
Aprovada em: 10 / 08 / 2010



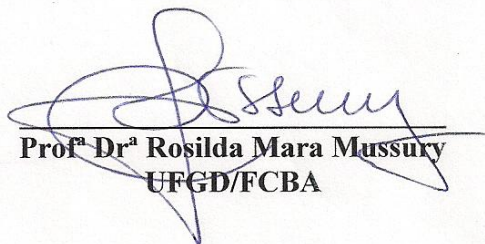
Profª Drª Yara B. Chaim J. Rosa
Orientadora – UFGD/FCA



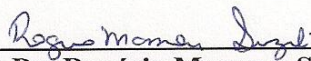
Prof. Dr. Edgard Jardim Rosa Júnior
Co-Orientador – UFGD/FCA



Profª Drª Silvana de Paula Q. Scalon
Co-Orientadora – UFGD/FCA



Profª Drª Rosilda Mara Mussury
UFGD/FCBA



Prof. Dr. Rogério Mamoru Suzuki
Co-Orientador – IBT/SP

*Aos meus pais: Sérgio e Salete
Aos meus irmãos: Marino e Maura,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e saúde;

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade;

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro;

A Prof^a. Dr^a. Yara Brito Chaim Jardim Rosa, orientadora e amiga, pela sabedoria, pelos conselhos, sugestões, correções e incentivo;

Aos membros da banca examinadora Dr^a. Silvana de Paula Quintão Scalon, Dr. Edgard Jardim Rosa Junior, Dr. Rogério Mamoru Suzuki e Dr^a. Rosilda Mara Mussury, pela atenção e correções;

Aos meus pais, Sérgio Sovierzoski Tatara e Salete Aparecida Sovierzoski Tatara pelo amor, apoio e compreensão nos momentos de minha ausência;

Aos meus irmãos Marino e Maura e minha avó Tereza pelo amor e amizade;

Ao Christian pelo carinho e paciência;

Às minhas colegas e amigas Marichel Canazza de Macedo, Débora Menani Heid e Jackeline Schultz Soares pelo companheirismo e valiosa ajuda;

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias, em especial, os responsáveis pelos laboratórios, Nilda, Ludmila e Bruno;

E, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
MATERIAIS E MÉTODOS	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE QUADROS

PÁGINA

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação (%G), número de plantas (NP), altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), massa fresca da parte aérea e de raiz (MFA e MFR), massa seca da parte aérea e de raiz (MSA e MSR) em função dos tratamentos com os reguladores de crescimento GA ₃ , BAP e ANA. UFGD, Dourados-MS, 2009	7
---	---

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. Planta de <i>Brassavola cebolleta</i> Rchb.F. UFGD, Dourados-MS, 2009.	5
FIGURA 2. a) Número de plantas (NP) e porcentagem de germinação (%G); b) Massa fresca da parte aérea (MFA) de <i>Brassavola cebolleta</i> observados em função das diferentes concentrações de GA ₃ utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	9
FIGURA 3. Massa fresca de raiz (MFR) e altura da planta (AP) de <i>Brassavola cebolleta</i> observados em função das diferentes concentrações de ANA utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	10
FIGURA 4. Número de raízes (NR) de <i>Brassavola cebolleta</i> observados em função das diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP ou com GA ₃ utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	11
FIGURA 5. a) Comprimento da maior raiz (CR); b) Massa seca de raiz (MSR) de <i>Brassavola cebolleta</i> observados em função das diferentes concentrações de ANA e GA ₃ utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	12
FIGURA 6. Número de raízes (NR) de <i>Brassavola cebolleta</i> observados em função das diferentes concentrações de GA ₃ e BAP utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	14
FIGURA 7. a) Comprimento da maior raiz (CR); b) Altura da planta (AP) de <i>Brassavola cebolleta</i> obtidos nas diferentes concentrações de BAP e GA ₃ utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	15
FIGURA 8. a) Massa fresca de raízes (MFR); b) Massa seca de raízes (MSR) de <i>Brassavola cebolleta</i> obtidas nas diferentes concentrações de GA ₃ e BAP utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	16
FIGURA 9. Número de plantas (NP) e porcentagem de germinação (%G) de <i>Brassavola cebolleta</i> obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	17
FIGURA 10. Massa fresca da parte aérea (MFA) de <i>Brassavola cebolleta</i> obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas no cultivo <i>in vitro</i> . UFGD, Dourados-MS, 2009	18

FIGURA 11. Número de folhas (NF) de *Brassavola cebolleta* obtidos em função das diferentes concentrações combinadas de ANA, GA₃ e BAP utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009 19

FIGURA 12. Massa seca da parte aérea (MSA) de *Brassavola cebolleta* obtidos em função das diferentes concentrações combinadas de ANA, GA₃ e BAP utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009. 20

TATARA, M. B. **Efeito de reguladores de crescimento na germinação e crescimento *in vitro* de *Brassavola cebolleta* Rchb. F. (Orchidaceae).** 2010. 26f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas associadas à germinação e ao crescimento vegetal de *Brassavola cebolleta* Rchb. F. quando em presença de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento em meio de cultura alternativo. O experimento, conduzido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da FCA/UFGD em Dourados/MS durante o período de fevereiro a novembro de 2009, foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos arranjados em esquema fatorial 3x3x3 (três concentrações de GA₃, três concentrações de BAP e três concentrações de ANA) com duas repetições. O meio de cultura foi enriquecido com os reguladores BAP e ANA e o GA₃ foi adicionado às sementes no momento do semeio. Após nove meses em sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlados (12 horas e 23±2°C) as plantas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto à porcentagem de germinação (%G); número de plantas (NP), folhas (NF) e raízes (NR); altura da parte aérea (AP); comprimento da maior raiz (CR); massa fresca e seca da parte aérea (MFA, MSA) e de raízes (MFR, MSR). As características vegetais foram submetidas à análise de variância e quando significativas à regressão. Os efeitos isolados e conjuntos dos reguladores de crescimento foram significativos (p< 0,05) para a maioria das características vegetais estudadas. De acordo com os resultados obtidos a utilização de GA₃ combinado ou não com BAP e ANA proporcionou diminuição na germinação e nos valores da maioria das características vegetais avaliadas. Embora para algumas características avaliadas os reguladores de crescimento (BAP e ANA) utilizados em conjunto tenham propiciado acréscimos nos valores dos atributos avaliados, os melhores resultados foram observados quando usados isoladamente.

Palavras-chave: semeio *in vitro*, GA₃, BAP e ANA.

TATARA, M. B. **Effect of growth regulators in the germination and *in vitro* growth of *Brassavola cebolleta* Rchb. F. (Orchidaceae).** 2010. 26f. Dissertation (Master in Agronomy). Federal University of Grande Dourados, Dourados – MS.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the responses associated with germination and plant growth of *Brassavola cebolleta* Rchb. F. in the presence of different combinations and concentrations of plant growth regulators in alternative culture medium. The experiment was conducted at the Laboratory of *In vitro* Cultivation of FCA/ UFGD in Dourados/MS during the period from February to November 2009. It was conducted in completely randomized design and treatments arranged in 3x3x3 factorial scheme (three concentrations of GA₃, three concentrations of BA and three concentrations of NAA) with two repetitions. The culture medium was enriched with regulators BA and NAA. The GA₃ was added in the seeds at the time of sowing. After nine months in a growth chamber with photoperiod and temperature controlled (12 hours and 23±2°C) the plants were removed from the flasks. It was evaluated the following characteristics: percentage of germination (%G); number of plants (NP), leaves (NF) and roots (NR); height of shoot (AP), length of largest root (CR), fresh and dry mass of shoots (MFA, MSA) and roots (MFR, MSR). The plant characteristics were submitted to variance analysis and when they were significant regression analysis were done. The single effects and combinations of growth regulators were significant (p <0.05) for most characteristics studied. According to the results obtained the use of GA₃ combined or not with BA and NAA caused reduction in germination and the values of most vegetal characteristics evaluated. Although the use of growth regulators (BA and NAA) together have increased the values of some characteristics evaluated, the best results were observed when they were used alone.

Keywords: seeding in vitro, GA₃, BA, NAA.

INTRODUÇÃO

A devastação das matas quer para o extrativismo madeireiro, aumento da área para a agricultura ou crescimento urbano, tem colocado muitas espécies de orquídeas nativas na lista de espécies ameaçadas de extinção (SUZUKI e FERREIRA, 2007; MELLO, 2000) sendo este processo acelerado pela evasão dos polinizadores naturais o que dificulta a reprodução de indivíduos remanescentes (MULLER et al., 2007). Outro agravante é a baixa porcentagem de germinação verificada naturalmente, pois as sementes de orquídeas são desprovidas de endosperma e geralmente dependem de associações com fungos micorrízicos para germinar (ARDITTI, 1982).

Sob este aspecto a situação do Estado de Mato Grosso do Sul insurge como preocupante, haja vista que se encontra sob avançado estágio de ação antrópica, principalmente pela substituição da mata original pela agricultura, existindo poucos trabalhos publicados acerca das exigências das espécies de Orchidaceae deste Estado.

A germinação *in vitro* viabiliza a produção de maior quantidade de plantas pois resulta em maiores percentuais de germinação em comparação à germinação natural (ARAÚJO, 2007) e é altamente vantajosa nos processos de repovoamento ou mesmo comercialização de espécies nativas (BACH e CASTRO, 2004) devido à variabilidade genética que possibilita a adaptação das plantas frente às novas condições ambientais.

Apesar de bastante utilizado, o cultivo *in vitro* de orquídeas ainda necessita de adequações, visto que em alguns casos, têm-se observado baixas taxas de germinação e lento crescimento das plântulas. O uso isolado ou conjunto de auxinas, citocininas e giberelinas têm sido relatados com maior ou menor sucesso no cultivo *in vitro*, uma vez que as respostas vegetais dependem da utilização de concentrações adequadas. Da mesma forma a eficiência do uso desses reguladores no semeio *in vitro* está diretamente relacionada ao conhecimento de seus efeitos sobre a espécie em estudo.

Dentre as espécies nativas de Cerrado encontra-se *Brassavola cebolleta* Rchb.F. (MENDONÇA et al., 1998), cuja ocorrência natural em uma porção de Mata Ciliar do Rio Dourados, em Dourados-MS foi relatada por Rech et al. (2005). A espécie destaca-se por seu elevado valor florístico e rusticidade, sendo o gênero *Brassavola* largamente utilizado na hibridação com *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronitis* e *Epidendrum*. Apesar dos efeitos extraordinários dessas hibridações poucas são as informações relativas à germinação assimbiótica desse gênero o que justifica este trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de Angiospermas, sendo constituída por aproximadamente 35.000 espécies, que se distribuem em todas as partes do planeta, excetuando-se as regiões polares e desérticas (DRESSLER, 1993). O Brasil dispõe de grande biodiversidade de orquidáceas, estando entre os três países do continente Americano com maior número de espécies, contabilizando 2419 espécies registradas (BARROS et al., 2010).

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais ou pela disseminação natural das sementes. Um único fruto contém milhares de sementes, desprovidas de endosperma e com embrião indiferenciado. Devido à ausência de endosperma, a germinação ocorre quando as sementes entram em contato com as micorrizas nas raízes das plantas adultas (HOFFMANN et al., 1997).

A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação em comparação à germinação natural (ARAÚJO, 2007) e as técnicas de cultura de tecidos surgem como uma alternativa viável para solucionar problemas relacionados ao cultivo e produtividade de várias espécies, possibilitando a rápida propagação de plantas com características agrônômicas superiores, assim como a produção de mudas em larga escala (MOURA et al., 2008).

Entretanto, apesar da evolução da orquidicultura ainda existem dificuldades em se obter um protocolo adequado a uma determinada espécie devido, em grande parte, à falta de conhecimento das interações fisiológicas que ocorrem nos processos de multiplicação *in vitro* (GIATTI e LIMA, 2007) ou à grande diversidade de espécies e híbridos da família.

Os eventos fisiológicos de germinação, crescimento e desenvolvimento que ocorrem nos vegetais representam um processo integrado e complexo, havendo uma estreita relação desses eventos com a ação de substâncias conhecidas como hormônios vegetais. Inúmeros compostos sintéticos (reguladores de crescimento vegetal) reproduzem os efeitos dos hormônios endógenos e seu uso é rentável e bastante utilizado (ROSA et al., 2002).

Segundo Murphy (2004) os processos vegetais controlados pelas auxinas se relacionam ao alongamento do caule, dominância apical, formação da raiz, desenvolvimento de frutos e tropismo. Kieber (2004) relata que as citocininas estão relacionadas aos processos fisiológicos de crescimento, incluindo a senescência foliar,

mobilização de nutrientes, dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes e a quebra de dormência das gemas. Davies (2004) cita que as giberelinas regulam vários processos fisiológicos incluindo, a germinação de sementes, a mobilização das reservas do endosperma, o crescimento da parte aérea, o florescimento, o desenvolvimento floral e o estabelecimento do fruto.

Embora muito utilizados, efeitos contraditórios sobre a atuação de auxinas, citocininas e giberelinas na germinação e desenvolvimento de plântulas de orquídeas têm sido relatados. Em geral, nas culturas *in vitro* utilizam-se reguladores de crescimento vegetal com funções auxínicas (BARROSO et al., 1990). Hadley e Harvais (1968) constataram que combinações de citocinina e auxina proporcionam um bom desenvolvimento de orquídeas e que fatores externos, como luz e temperatura, influenciam esse processo.

O uso de reguladores químicos como tratamento pré-germinativo pode auxiliar no processo de germinação e desenvolvimento de plântulas. Miyoshi e Mii (1995), constataram que o ácido naftalenacético (ANA), Ethephon e 6 benzilaminopurina (BAP) promovem aumento na formação de protocormos de *Calanthe discolor* Lindl., entretanto, a utilização de GA₃ não exerce efeito estimulador na germinação das sementes e formação de protocormos.

A adição de citocinina (cinetina) ao meio de Murashige e Skoog melhorou a germinação de *Comparettia falcata* (PEDROZA-MANRIQUE et al., 2005), mas a adição de BAP em outros meios de cultura proporcionou efeitos negativos na germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium eugenii* e *C. cristatum* (CARAMASCHI e CALDAS, 1999). Araújo (2007) observou que a presença de GA₃ no meio de cultura interferiu negativamente no desenvolvimento radicular e no acúmulo de biomassa de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo'.

Assim como os reguladores de crescimento, a utilização de produtos orgânicos tem apresentado respostas positivas no desenvolvimento *in vitro* de várias plantas. Campos (2002) propõe um meio alternativo constituído por tomate cereja, banana nanica, água de coco, carvão ativado e ágar para a germinação de Orchidaceae. Pasqual et al. (2009) relatam a viabilidade da multiplicação *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* em meio Knudson C enriquecido com polpa de banana nanica assim como Araújo et al. (2006) que observaram efeitos benéficos no crescimento de plântulas

de *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba' cultivadas em meio Knudson C suplementado com água de coco e banana.

O sucesso da reprodução de uma determinada espécie de Orchidaceae depende, portanto, da obtenção de um protocolo que possibilite otimização da germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* para uma posterior eficiente aclimatização das plântulas produzidas.

Em vista do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar as respostas associadas à germinação e ao crescimento inicial de *Brassavola cebolleta* quando em presença de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento vegetal (GA₃, BAP e ANA) adicionados ao meio de cultura alternativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados – MS durante o período de fevereiro a novembro de 2009. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 3x3x3 (três concentrações de GA₃, três concentrações de BAP e três concentrações de ANA), apresentando 27 diferentes combinações, com duas repetições cada.

Foram utilizadas como material de estudo sementes de *Brassavola cebolleta* Rchb.F. (Figura 1) provenientes de polinização natural. Cápsulas maduras foram coletadas e as sementes foram retiradas, homogeneizadas, pesadas e, 5 mg submetidas ao teste de tetrazólio que resultou em 522,46 sementes viáveis por mg de sementes.



FIGURA 1. Planta de *Brassavola cebolleta* Rchb.F. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Utilizou-se o meio de cultura proposto por Campos (2002), modificado pela utilização de 70 g L⁻¹ de tomate maduro sem casca e sementes, 50 g L⁻¹ de banana nanica madura sem casca, 150 mL L⁻¹ de água de coco verde, 3 mL L⁻¹ de NPK 10-10-10, 17 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 25 g L⁻¹ de açúcar cristal, 3 g L⁻¹ de carvão ativado, acrescido dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) (nas concentrações 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (nas concentrações 0,0; 0,01 e 0,02 mg L⁻¹) em todas as combinações possíveis. Após a homogeneização em liquidificador, os meios foram completados com água destilada

para um litro e o pH ajustado para 5,5 com KOH, sendo 80 mL de cada meio de cultura transferido para frascos de 600 mL providos de tampa metálica, para esterilização em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1 atm de pressão.

Após solidificação do meio de cultura os frascos foram transportados para câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada por 30 minutos com luz germicida, para realização do semeio *in vitro*. Três porções de 15 mg de sementes foram desinfestadas com uma solução composta de água destilada esterilizada e hipoclorito de sódio (2,5%) na proporção 1:1, por 15 minutos e posteriormente diluídas para 60 mL com água destilada esterilizada e enriquecidas com ácido giberélico (GA₃) nas concentrações de 0,0 ou 2,0 ou 4,0 mg L⁻¹. Após a adição do regulador de crescimento, os volumes foram completados para 100 mL com água destilada esterilizada.

Em cada frasco foi inoculado, por meio de pipetador automático, 2 mL da suspensão de sementes de cada concentração de GA₃ que continha cerca de 156 sementes viáveis.

Após o semeio, os frascos foram tampados e acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 23±2°C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 28 μmol m⁻² s⁻¹, provenientes de lâmpadas fluorescentes (40W).

Decorridos nove meses do semeio, foram contabilizados o número de plantas (NP) e calculada a porcentagem de germinação (%G) levando-se em conta o número médio de sementes viáveis inoculados em cada frasco e o número de plântulas existentes. As plântulas, após a completa remoção do substrato, foram avaliadas quanto à altura (AP), número de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca e seca da parte aérea (MFA, MSA) e de raízes (MFR, MSR).

As variáveis contínuas foram transformadas para $\sqrt{x+1}$ e posteriormente todas as características vegetais foram submetidas à análise de variância e, quando significativas comparadas por meio de regressão (BANZATO e KRONKA, 1992) com a utilização do aplicativo computacional SISVAR (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes iniciou-se aproximadamente 30 dias após o semeio quando foi possível visualizar protocormos verdes a olhu nu e prolongou-se até o 60º dia, sendo a germinabilidade média igual a 2,54%.

Os quadrados médios e as médias gerais das características avaliadas no final do experimento assim como a significância ou não dos fatores estudados e das suas interações pela análise estatística são apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação (%G), número de plantas (NP), altura da planta (AP), número de folhas (NF), número de raízes e comprimento da maior raiz (NR e CR), massa fresca da parte aérea e de raiz (MFA e MFR), massa seca da parte aérea e de raiz (MSA e MSR) em função dos tratamentos com os reguladores de crescimento GA₃, BAP e ANA. UFGD, Dourados-MS, 2009.

F.V.	GL.Quadrados médios.....				
		%G	NP	AP	NF	NR
GA ₃	2	1,388**	3,550**	0,039 ^{ns}	67,08**	15,131**
BAP	2	0,055 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,001 ^{ns}	9,09*	10,132**
ANA	2	0,166 ^{ns}	0,223 ^{ns}	0,058*	21,52**	18,253**
GA ₃ x BAP	4	0,111 ^{ns}	0,079 ^{ns}	0,039*	2,83 ^{ns}	4,574*
GA ₃ x ANA	4	0,138 ^{ns}	0,168 ^{ns}	0,010 ^{ns}	2,78 ^{ns}	4,181*
BAP x ANA	4	0,555**	0,732**	0,025 ^{ns}	21,44**	4,456*
GA ₃ x BAP x ANA	8	0,111 ^{ns}	0,181 ^{ns}	0,021 ^{ns}	5,70*	0,787 ^{ns}
Resíduo	27	0,129	0,092	0,012	1,82	1,377
CV(%)		18,52	14,03	6,47	14,83	21,51
Média geral		2,54%	3,96	1,99 cm	89,12	32,16
F.V.	GL.	CR	MFA	MFR	MSA	MSR
GA ₃	2	3,324**	0,183**	0,949**	2,971**	1,705**
BAP	2	1,405*	0,069*	0,508**	0,445*	0,639**
ANA	2	1,227 ^{ns}	0,086**	1,017**	0,562**	1,181**
GA ₃ x BAP	4	1,507*	0,016 ^{ns}	0,340**	0,311*	0,485**
GA ₃ x ANA	4	1,197*	0,030 ^{ns}	0,187 ^{ns}	0,459**	0,287*
BAP x ANA	4	0,613 ^{ns}	0,127**	0,139 ^{ns}	1,626**	0,147 ^{ns}
GA ₃ x BAP x ANA	8	0,835 ^{ns}	0,030 ^{ns}	0,121 ^{ns}	0,497**	0,106 ^{ns}
Resíduo	27	0,417	0,013	0,072	0,094	0,093
CV(%)		20,71	31,10	40,87	24,96	41,60
Média geral		3,12 cm	0,37 g	0,65 g	0,04 g	0,07 g

** significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

Os reguladores vegetais isoladamente influenciaram ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) a maioria das características de *Brassavola cebolleta* Rchb.F., excetuando-se a % de germinação e o número de plantas (BAP; ANA), altura da planta (GA_3 ; BAP) e comprimento da maior raiz (ANA) (Quadro 1).

Os efeitos conjuntos de GA_3 e BAP não foram significativos ($p > 0,05$) para a %G, NP, NF e MFA. Também não foram registrados efeitos conjuntos de GA_3 e ANA ($p > 0,05$) sobre %G, NP, AP, NF, MFA, MFR e os efeitos conjuntos de BAP e ANA também não foram observados ($p > 0,05$) sobre AP, CR, MFR e MSR (Quadro 1).

Foram observados efeitos conjuntos dos três reguladores vegetais sobre a MSA ($p < 0,01$) e sobre o NF ($p < 0,05$) (Quadro 1).

Efeitos lineares decrescentes foram observados sobre a porcentagem de germinação (%G) e o número de plantas (NP) à medida que se aumentaram as concentrações de GA_3 utilizadas na embebição de sementes (Figura 2a).

Embora os valores médios de %G e NP de *B. cebolleta* tenham sido baixos a utilização de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 reduziu em cerca de 50% a germinabilidade e o número de plântulas da espécie (Figura 2a). Soares (2010) também obteve redução da porcentagem de germinação e número de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. que tiveram suas sementes embebidas em GA_3 por 24 horas, semeadas em meio de cultura alternativo como o utilizado neste trabalho.

No entanto, Leite e Hebling (2007) obtiveram efeitos contrários ao observados nesse experimento ao constatar que à medida que se aumentou a concentração de GA_3 no meio de cultura de 0 para 20 mg L^{-1} houve um acréscimo de 75,5% na germinabilidade de *Cattleya warnerii* T. Moore em culturas mantidas na ausência de luz. Culturas mantidas sob regime de luz não foram influenciadas pelas doses de GA_3 estudadas pelos autores.

A comparação dos resultados desses trabalhos sugere que o desempenho de GA_3 além de depender da diversidade da resposta vegetal é influenciado por fatores abióticos tais como temperatura, luminosidade, composição do meio de cultura.

Em decorrência dos resultados observados neste trabalho, sugere-se condução de estudos que envolvam sementes de *B. cebolleta* e GA_3 na ausência de luminosidade, com uma alternativa para elevação da germinabilidade *in vitro* da espécie.

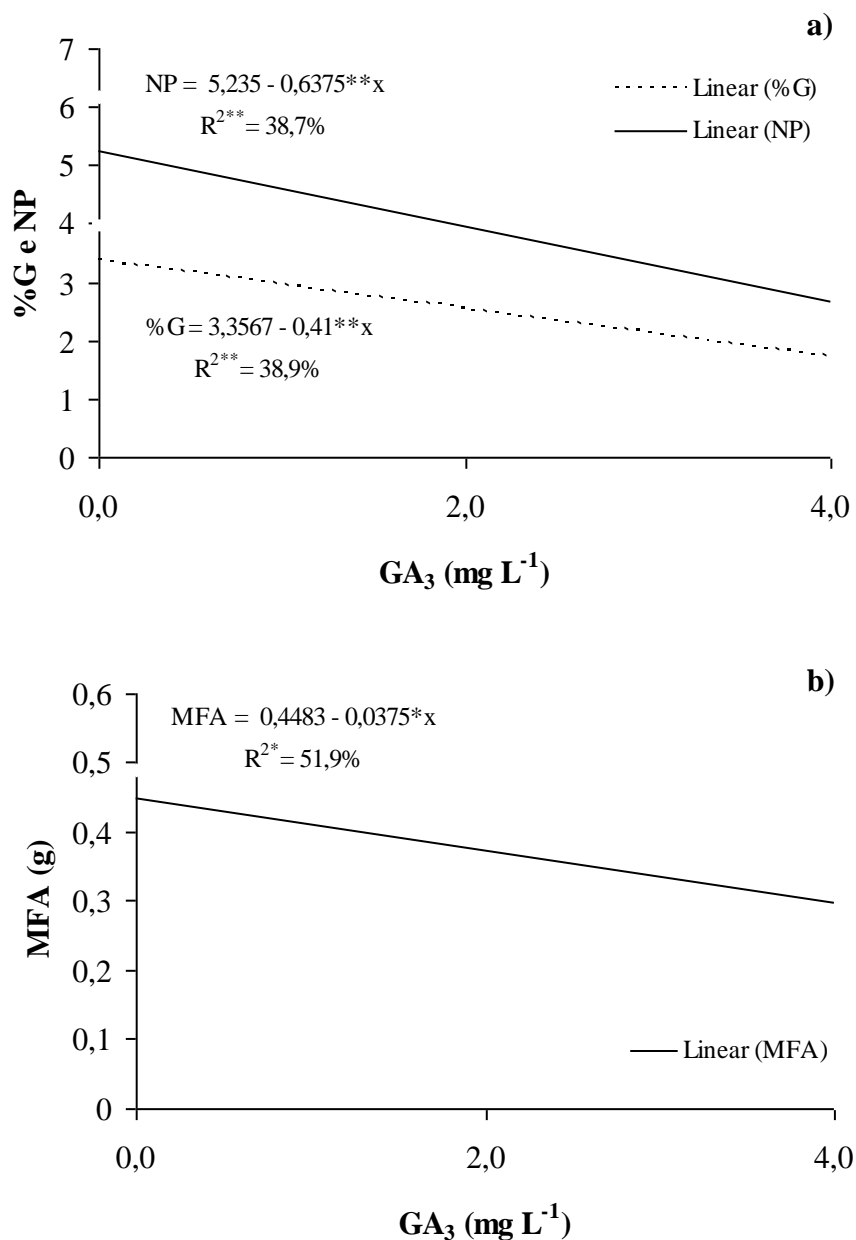


FIGURA 2. a) Número de plantas (NP) e porcentagem de germinação (%G); b) Massa fresca da parte aérea (MFA) de *Brassavola cebolleta* observados em função das diferentes concentrações de GA₃ utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

O fornecimento de GA₃ às sementes resultou posteriormente na diminuição da MFA das plântulas originadas (Figura 2b). Ávila-Díaz et al. (2009) embora tenham obtido plântulas de *Laelia speciosa* mais longas ao utilizar 28,87 µM (equivalente à 9,989 mg L⁻¹) de GA₃ no meio de cultivo constataram que essas mudas apresentavam caules fracos e finos.

Na Figura 3 observa-se que maiores concentrações de ANA proporcionaram maiores valores de AP e de MFR. Esses resultados concordam com relato de Murphy (2004) que salienta que entre os processos vegetais controlados pelas auxinas se relacionam o alongamento do caule e a formação da raiz; no entanto não concordam com os resultados obtidos por Rezende et al. (2009) que observaram melhores valores de comprimento da parte aérea de *Cattleya loddigesii* sp. em tratamentos sem adição de ANA, reforçando informações da literatura de que a ação hormonal varia, dentre outros fatores, com a espécie e concentrações avaliadas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

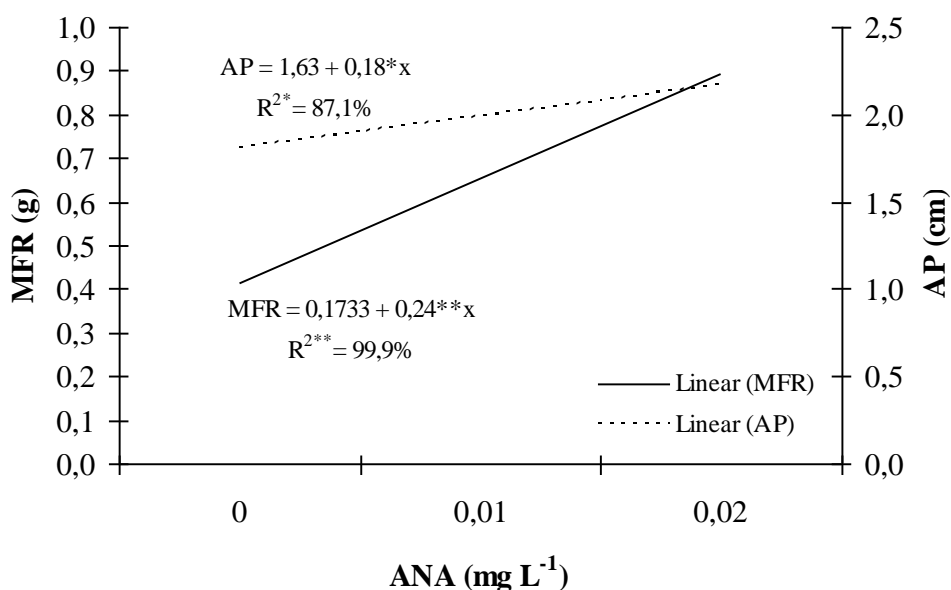


FIGURA 3. Massa fresca de raiz (MFR) e altura da planta (AP) de *Brassavola cebolleta* observados em função das diferentes concentrações de ANA utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Segundo Haissig (1972) as auxinas aumentam a formação de raízes em tecidos que naturalmente apresentam predisposição ao enraizamento, o que foi constatado também neste trabalho. Ávila-Diaz et al. (2009) também observaram maior produção de raízes de *Laelia speciosa* quando o meio de cultura era suplementado com 0,25 mg L⁻¹ de ANA ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA com 0,1 mg L⁻¹ de GA₃.

Na Figura 4 observam-se efeitos lineares crescentes da combinação de ANA com BAP ou ANA com GA₃ sobre o número de raízes ($p > 0,05$). No entanto, ao utilizar ANA isoladamente observa-se maior aumento no número de raízes (NR) quando comparados aos tratamentos que receberam as concentrações 1,0 mg L⁻¹ de BAP ou 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 4).

Para a dose 0,5 mg L⁻¹ de BAP foram registradas 21,55 raízes e para a concentração 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ foram registradas 22,94 raízes independentemente da dose de ANA utilizada (p>0,05).

$$\begin{aligned} \text{BAP}_{(0,0)} &= 17,528 + 1941,5^{**}x & R^{2**} &= 96,8\% \\ \text{BAP}_{(1,0)} &= 25,35 + 1265^{*}x & R^{2*} &= 62,5\% \\ \text{GA}_{3(0,0)} &= 20,327 + 2567^{**}x & R^{2**} &= 95,1\% \\ \text{GA}_{3(4,0)} &= 18,803 + 875^{*}x & R^{2*} &= 80,6\% \end{aligned}$$

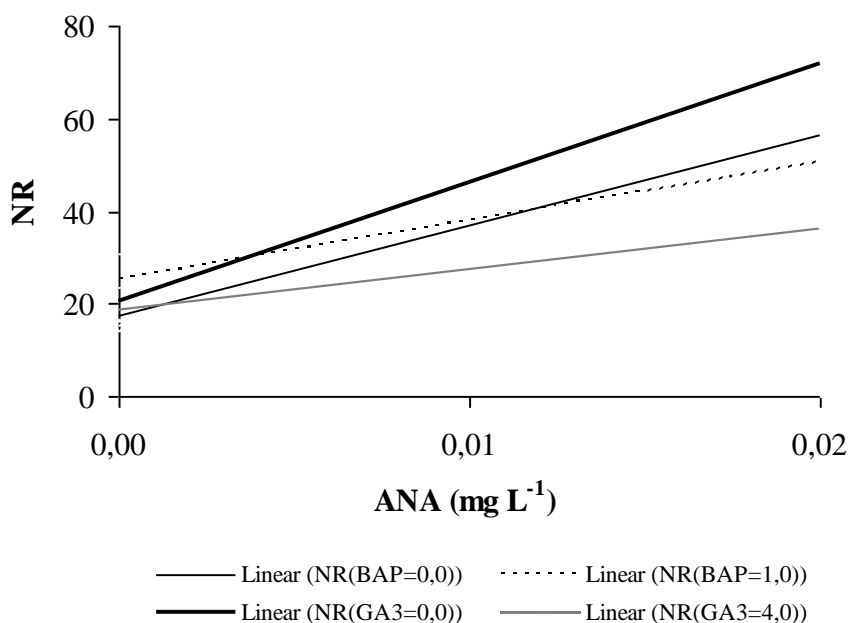


FIGURA 4. Número de raízes (NR) de *Brassavola cebolleta* observados em função das diferentes concentrações de ANA combinadas com BAP ou com GA₃ utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Haissig (1972) comenta que a formação de primórdios radiculares é dependente da auxina, e observa que GA₃ reduz a divisão celular de primórdios radiculares de *Salix fragilis* L., sugerindo que esse regulador de crescimento interfere na atuação da auxina, o que pode ter acontecido também com *B. cebolleta* quando ANA foi combinada com 4,0 mg L⁻¹ de GA₃.

Respostas análogas ao número de raízes foram observadas para o comprimento da maior raiz (CR) e massa seca do sistema radicular (MSR) quando se utilizou a combinação de ANA com GA₃ cujos maiores valores foram observados na ausência de GA₃. Para a MSR o aumento da dose de ANA na ausência de GA₃ propiciou um efeito linear crescente, enquanto que para o CR, independentemente da dose de ANA utilizada o comprimento médio da maior raiz foi de 3,61cm (Figuras 5a e 5b).

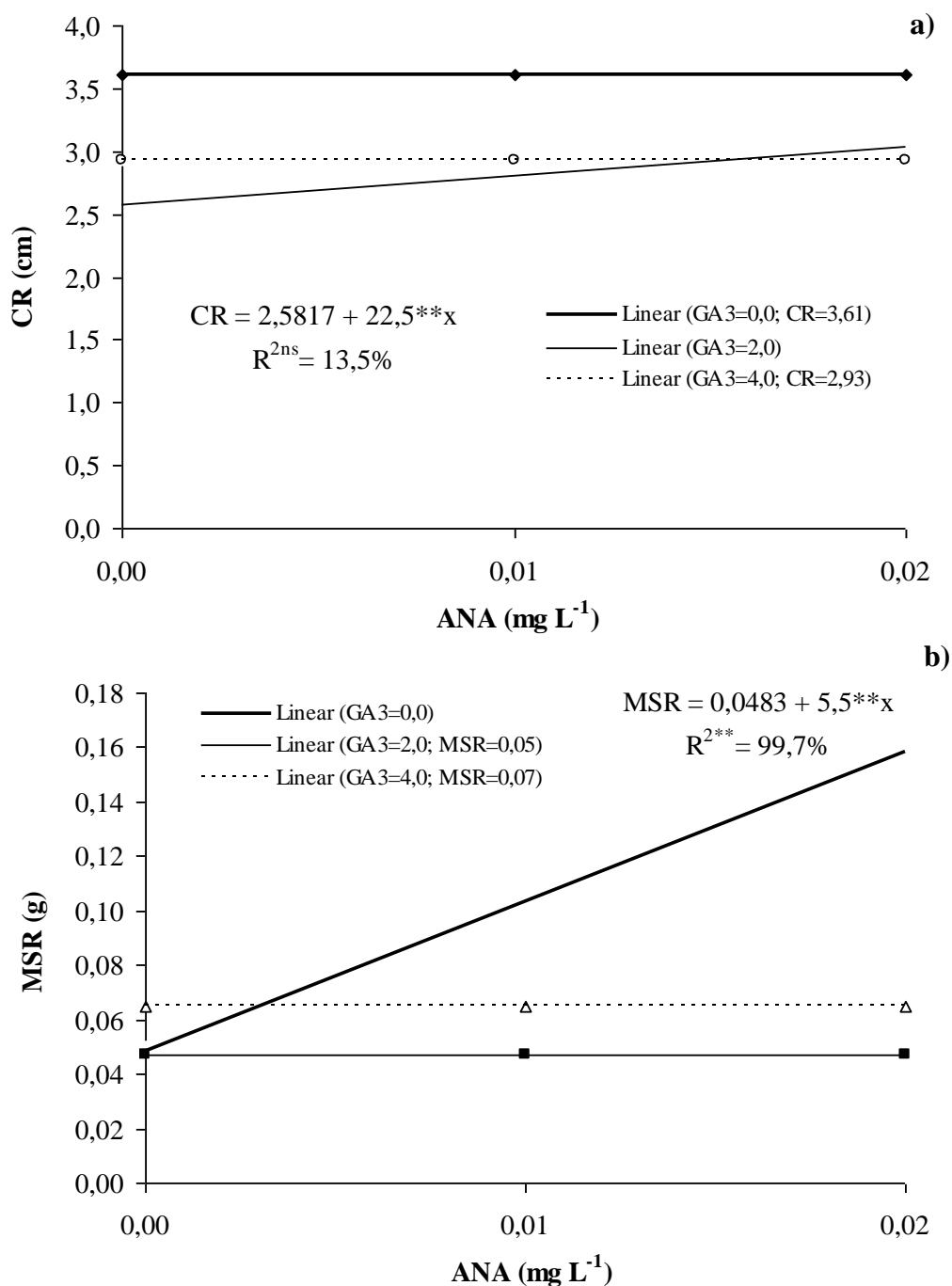


FIGURA 5. a) Comprimento da maior raiz (CR); b) Massa seca de raiz (MSR) de *Brassavola cebolleta* observados em função das diferentes concentrações de ANA e GA₃ utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

A utilização de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ propiciou CR iguais a 2,93 cm e MSR de 0,07 g independentemente da dose de ANA acrescentada ao meio de cultura. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ propiciou MSR iguais a 0,05 g e efeitos lineares crescentes em CR à medida que se aumentaram as doses de ANA (Figuras 5a e 5b).

A atuação de ANA no crescimento e desenvolvimento das raízes pode ser melhor observada quando esse regulador de crescimento é utilizado na ausência de GA₃ (Figuras 5a e 5b). Rezende et al. (2009) também observaram maior número de raízes e melhor crescimento de raiz em plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. cultivadas na ausência de GA₃ associada a presença de 60 g L⁻¹ de sacarose.

As espécies de orquídea *Epidendrum ibaguense* Kunth. e *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. também tiveram o crescimento do sistema radicular promovido pela utilização de auxina, sendo os melhores resultados proporcionados com utilização de 0,5 mg L⁻¹ de AIA (HOSSAIN, 2008; HOSSAIN et al., 2010).

Ao analisar os efeitos conjuntos de GA₃ e BAP foram observados efeitos lineares decrescentes para o número de raízes (NR) à medida que as concentrações 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP foram combinadas com concentrações crescentes de GA₃ (Figura 6).

Aparentemente BAP e GA₃ atuaram inibindo a formação de raízes, ainda assim o balanço hormonal de 0,5 mg L⁻¹ de BAP com as concentrações de GA₃ diminuiu a intensidade do efeito inibitório dessa giberelina proporcionando NR médio igual a 21,5 independentemente da concentração de GA₃ utilizada, sendo este valor muito próximo ao observado na combinação de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ com as concentrações 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 6).

O efeito inibitório da atuação de GA₃ já foi registrado também na %G, NP e MFA (Figuras 2a e 2b). O efeito antagônico de GA₃ para a característica NR também pode ser observada na Figura 4 quando 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ é combinada com diferentes doses de ANA.

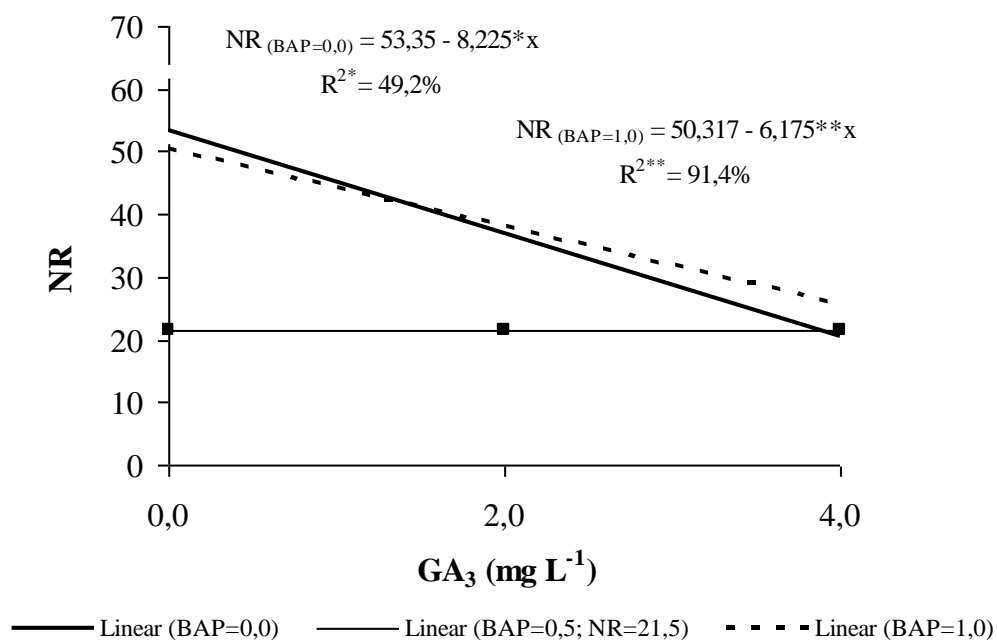


FIGURA 6. Número de raízes (NR) de *Brassavola cebolleta* observados em função das diferentes concentrações de GA_3 e BAP utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

A utilização de BAP isoladamente (sem adição de GA_3) proporcionou valores lineares crescentes no comprimento da maior raiz (CR) enquanto que sua combinação com GA_3 nas doses 2,0 e 4,0 $mg L^{-1}$ propiciaram respectivamente valores de 2,81 cm e 2,93 cm independentemente da dose de BAP utilizada. (Figura 7a), sendo esses valores semelhantes aos obtidos na ausência dos dois reguladores estudados indicando o efeito inibitório de GA_3 sobre a atuação de BAP em promover o crescimento radicular.

A utilização de BAP associada à maior dose de GA_3 (4,0 $mg L^{-1}$) propiciou decréscimo na altura de plantas a medida que se aumentaram as concentrações de BAP. Os melhores valores de AP (2,16 cm) foram observados na ausência de GA_3 (Figura 7b).

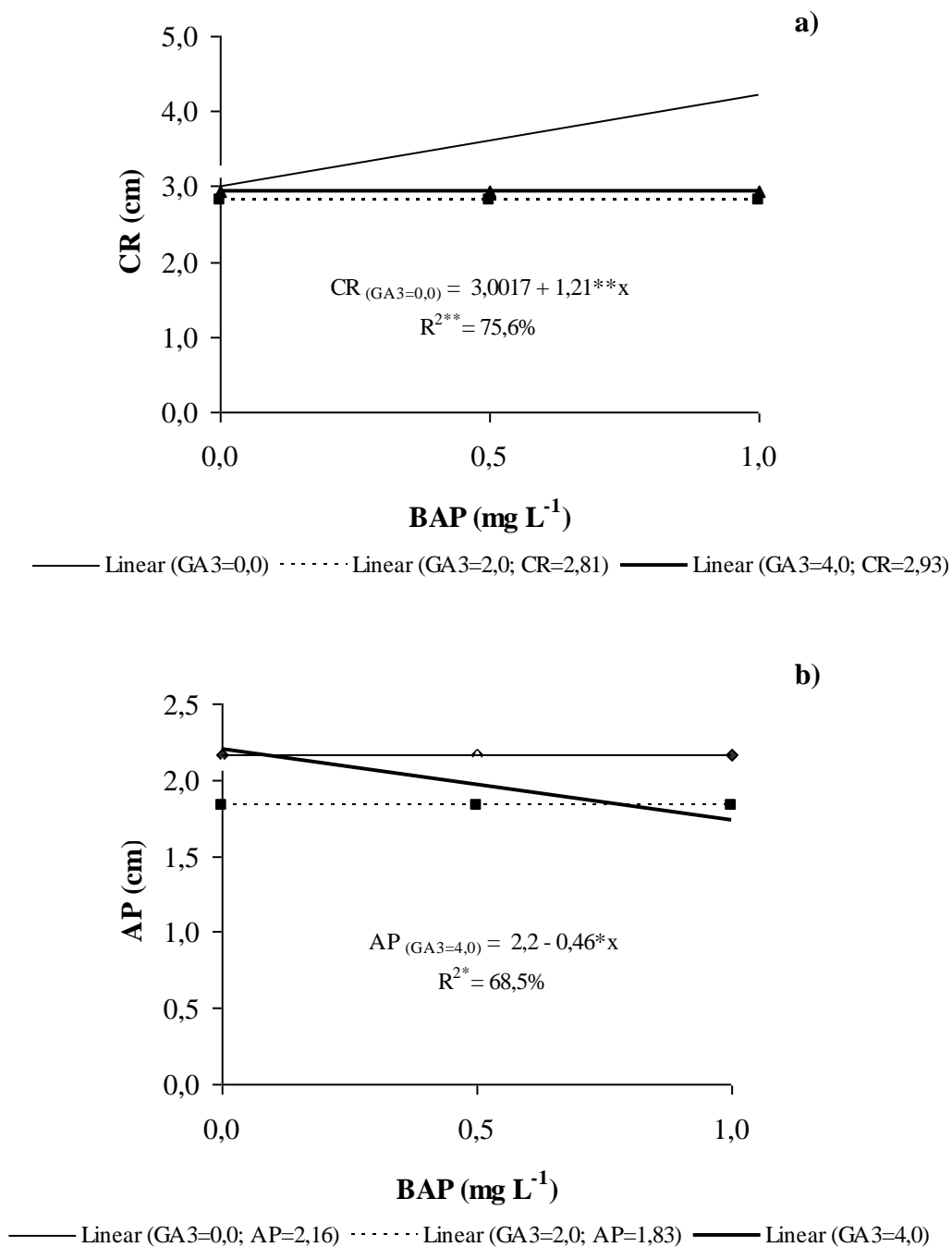
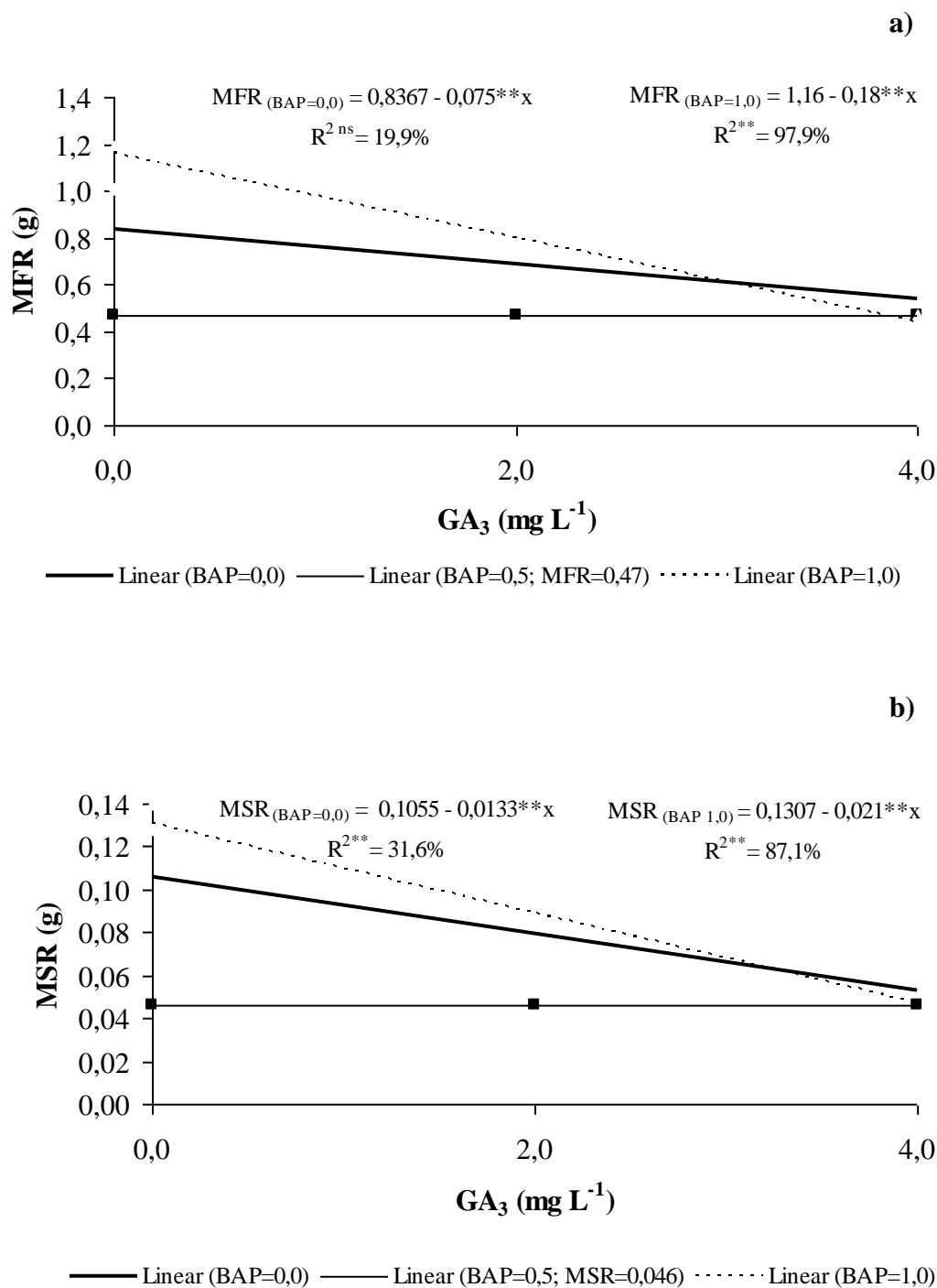


FIGURA 7. a) Comprimento da maior raiz (CR); b) Altura da planta (AP) e de *Brassavola cebolleta* obtidos nas diferentes concentrações de BAP e GA₃ utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Aparentemente a combinação de BAP e GA₃ nas concentrações estudadas atuaram antagonicamente e, além disso, tiveram efeito aditivo negativo no crescimento da parte aérea (Figura 7b).

Como apresentado nas Figuras 6 e 7a nas quais o aumento de concentração de GA₃ inibiu o número (Figura 6) e o comprimento (Figura 7a) de raízes de *B. cebolleta* respostas semelhantes à atuação conjunta de GA₃ e BAP foram registradas para MFR e MSR (Figuras 8a e 8b) confirmando o efeito inibitório de GA₃ à atuação do BAP também sobre estas características desta orquídea.



Assim como observado para NR (Figura 6) a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP com as concentrações de GA₃ não apresentaram diferença estatística (p>0,05) para MFR e MSR e resultaram, respectivamente, em 0,47 e 0,046 g sendo estes os menores valores registrados para estas características (Figuras 8a e 8b).

Araújo et al. (2009) também observaram interferência negativa no crescimento de plantas de *Cattleya loddigesii* Lindl. cultivadas em meio de cultura acrescido de concentrações de GA₃ que variavam de 0,0 a 20 mg L⁻¹. Os autores relatam que doses crescentes desse regulador proporcionaram diminuição nos valores de comprimento da parte aérea, comprimento de raízes, número de raízes e massa fresca de plântulas.

Provavelmente os efeitos negativos do GA₃ estejam também relacionados à forma pela qual esse regulador foi fornecido, pois as sementes e plântulas permaneceram imersas nessa solução continuamente. O que pode ter influenciado a atuação dos demais reguladores.

Os efeitos da combinação de BAP com ANA sobre a porcentagem de germinação (%G) e o número de plantas (NP) foram observados (p<0,05) quando se utilizou as doses 0,00 e 0,01 mg L⁻¹ de ANA (Figura 9).

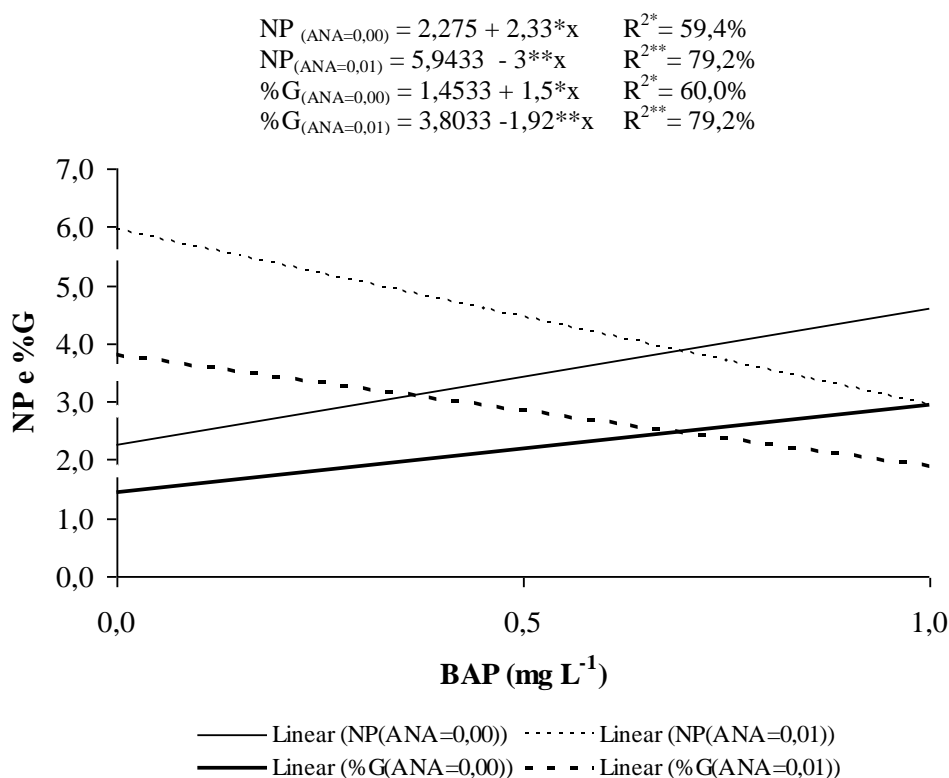


FIGURA 9. Número de plantas (NP) e porcentagem de germinação (%G) de *Brassavola cebolleta* obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Ao utilizar BAP isoladamente (sem adição de ANA) observa-se efeito linear crescente na %G e no NP à medida que se aumentam as concentrações de BAP (Figura 9). Os resultados observados neste trabalho, entretanto, discordam dos obtidos por Caramaschi e Caldas (1999) que verificaram efeitos deletérios para germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium* spp. ao utilizar BAP no meio de cultura.

O efeito contrário acontece quando se adiciona 0,01 mg L⁻¹ de ANA com as concentrações crescentes de BAP observando-se a diminuição na %G e no NP (Figura 9). Esses resultados sugerem que a interação de BAP e ANA inibe a germinação e formação das plantas de *B. cebolleta*. Pedroza-Manrique et al. (2005) também obtiveram diminuição na porcentagem de germinação ao combinar auxina (AIA) com citocinina (cinetina) ou giberelina (GA₃), sugerindo que a auxina seja responsável pelo efeito negativo da interação.

A utilização isolada de BAP ou combinada com 0,02 mg L⁻¹ de ANA resultou em incrementos na MFA à medida que se aumentou a dose de BAP, mas não houve diferença estatística entre as concentrações de BAP quando combinadas com 0,01 mg L⁻¹ de ANA para MFA, que apresentou valor médio de 0,34 g (Figura 10).

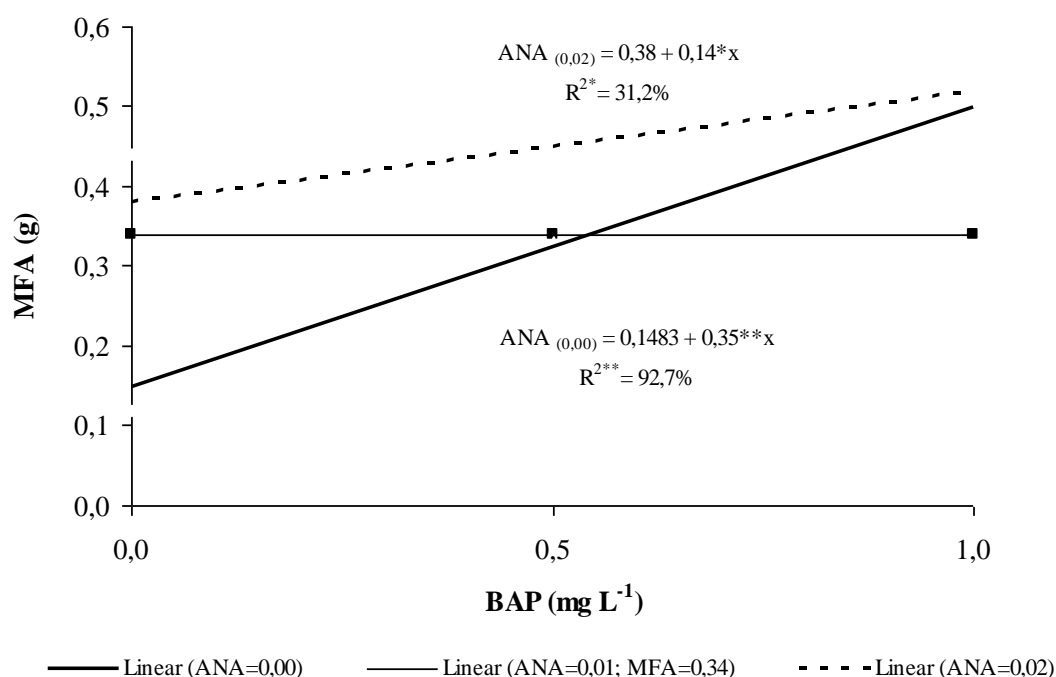


FIGURA 10. Massa fresca da parte aérea (MFA) de *Brassavola cebolleta* obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Um incremento mais acentuado na MFA foi observado quando o BAP foi o único regulador utilizado no meio de cultura. No entanto, os melhores resultados foram obtidos com a combinação das maiores doses de BAP e ANA (Figura 10), evidenciado o papel fundamental que a auxina e a citocinina desempenham no controle do desenvolvimento da planta, a primeira apresentando atividade fisiológica sobre o alongamento e divisão celular e a segunda promovendo a divisão e diferenciação celular (KERBAUY, 2004).

Estes resultados concordam com aqueles observados por Araújo et al. (1999) que obtiveram melhor crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* em meio MS acrescido de 5 mg L⁻¹ de cinetina e 30 mg L⁻¹ de AIA.

Os melhores resultados para número de folhas (NF) são observados nos tratamentos onde se utiliza somente ANA sendo que à medida que se aumenta a concentração desse regulador há um aumento linear no número de folhas (NF) produzidas (Figura 11).

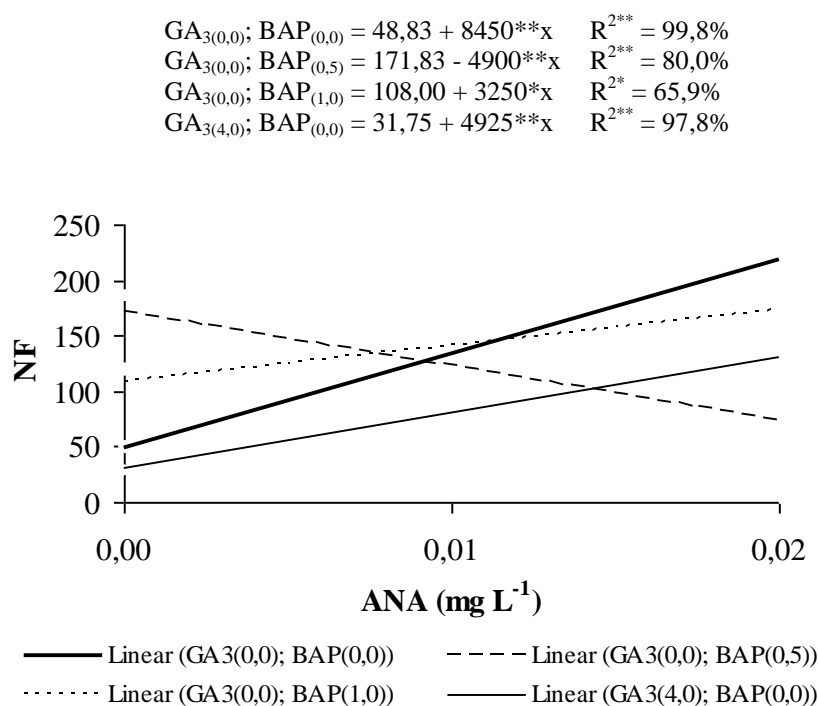


FIGURA 11. Número de folhas (NF) de *Brassavola cebolleta* obtidos em função das diferentes concentrações combinadas de ANA, GA₃ e BAP utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Esse aumento no NF também acontece quando se aumenta a concentração de ANA combinada com 1,0 mg L⁻¹ de BAP ou 4,0 mg L⁻¹ de GA₃, no entanto em proporções menores aos valores obtidos quando se utilizou somente ANA (Figura 11).

Embora auxina e citocinina sejam necessárias, nem sempre atuam de forma sinérgica. A concentração 0,5 mg L⁻¹ de BAP combinado com ANA, causou um decréscimo linear no número de folhas (NF) à medida que aumentou a concentração de ANA (Figura 11). Uma dessas classes hormonais pode ter influenciado a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese ou inativação da outra (KERBAUY, 2004) provocando esse efeito negativo sobre o NF.

Os melhores resultados para massa seca da parte aérea (MSA) são observados nos tratamentos onde se utiliza somente ANA sendo que à medida que se aumenta a concentração desse regulador há um aumento linear na massa seca da parte aérea (MSA) (Figura 12). Souto et al. (2010) também observaram incremento na matéria seca caulinar em plantas de *Cattleya bicolor* Lindl. cultivadas na presença de ANA na concentração de 0,5 mg L⁻¹.

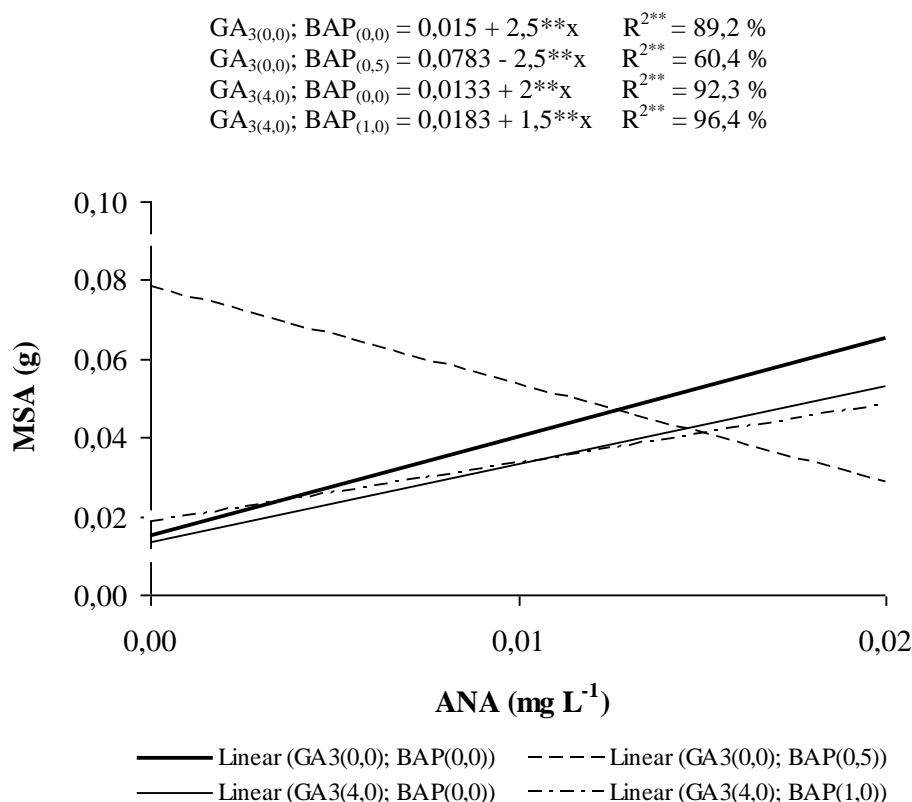


FIGURA 12. Massa seca da parte aérea (MSA) de *Brassavola cebolleta* obtidos em função das diferentes concentrações combinadas de ANA, GA₃ e BAP utilizadas no cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2009.

Resultados semelhantes aos obtidos quando ANA é utilizada isoladamente foram também observados quando esse regulador é combinado com a concentração 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ e ausência de BAP ou quando combinado com 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ mais 1,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 12).

O efeito antagônico entre BAP e ANA aconteceu quando se utilizou a dose de 0,5 mg L⁻¹ de BAP combinada com concentrações crescentes de ANA, causando um decréscimo linear na massa seca da parte aérea (Figura 12). No entanto, quando BAP, nessa concentração, foi utilizado isoladamente propiciou o maior incremento na MSA comparado aos demais tratamentos.

De forma geral, a adição do GA₃ isolado ou em combinação com os outros reguladores (ANA e BAP) no meio de cultura proporcionou decréscimos na germinação e crescimento de plântulas de *B. cebolleta*. Esses resultados também podem ser relacionados à composição do meio de cultura utilizado no presente trabalho, cujos ingredientes orgânicos (tomate, banana e água de coco) fornecem substâncias como aminoácidos, vitaminas e hormônios vegetais de quantificação indefinida, influenciando na atuação dos reguladores adicionados ao meio (STANCATO et al., 2008; ARAÚJO, et al., 2006).

Os hormônios exógenos podem provocar alterações no nível hormonal endógeno sendo as respostas vegetais dependentes do metabolismo do hormônio - sua biossíntese, transporte, inativação ou degradação (KERBAUY, 2004) e a forma pela qual os reguladores de crescimento foram disponibilizados pode ter alterado essas vias fisiológicas, deve-se ainda, considerar as condições de temperatura, fotoperíodo e luminosidade as quais também controlam as respostas vegetais.

CONCLUSÕES

A utilização de GA₃ na embebição de sementes de *Brassavola cebolleta* Rchb. F., combinado ou não com BAP e ANA proporcionou diminuição na germinação e nos valores da maioria das características vegetais avaliadas.

Os reguladores de crescimento BAP e ANA proporcionaram acréscimos na maioria dos atributos avaliados, entretanto os melhores resultados foram observados quando utilizados isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. G. de; CARNEIRO, I. F.; PRABHU, A. S. Produção *in vitro* de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, n.2, p.67-71, 1999.

ARAÚJO, A. G. de. **Micropropagação de *Cattleya loddigesii* “Tipo”: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico**. 2007. 74f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, J. D.; CASTRO, E. M. de; SANTOS, A. M. 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, set./out. 2009.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, v.53: p.608-613, 2006.

ARDITTI, J. Orchid seed germination and seedling culture – A manual. In: ARDITTI, J.; CLEMENTS, G.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G.; ERNST, R. **Orchid biology: reviews and perspectives II**. New York: Cornell University Press. 1982. p.244-270.

ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, n.3, p.335–343, dez. 2009.

BACH, E. E.; CASTRO, O. L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp. (Orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p.1-749, 2004.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247 p.

BARROS, F. de, VINHOS, F., RODRIGUES, V. T., BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N. Orchidaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>>. Acesso em: 6 jul. 2010.

BARROSO, J.; FEVEREIRO, P.; OLIVEIRA, M. M.; PAIS, M. S. S. In vitro seed germination, differentiation and production of miniturbers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. **Scientia Horticulturae**, v. 42, p. 329-337, 1990.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.

CARAMASCHI, G. M. C. L.; CALDAS, L. S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.175, 1999.

DAVIES, P. J. Giberelinas: reguladores da altura dos vegetais. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 485-516.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides press, 1993. 314p

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de Experimentos - SISVAR. **Universidade Federal de Lavras**. 2003.

GIATTI, L.; LIMA, G. P. P. Ação do BAP na regeneração *in vitro* de *BLC* Owen Holmes Ponkan x *Brassavola digbiana* n°2. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.5, p.1279-1285, 2007.

HADLEY, G.; HARVAIS, G. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of Orchids pupurella. **New Phytologist**. v.67, p.44, 1968.

HAISSIG, B. E. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. **Plant Physiology**, v.49, p. 886-892, 1972.

HOFFMANN, A. M.; PASQUAL, G. R.; CARVALHO, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: aplicações na propagação de plantas**. Universidade Federal de Lavras: Lavras, 1997. 130 p

HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.20, p. 3614-3619, out. 2008.

HOSSAIN, M. M; SHARMA, M.; SILVA, J. A. T. da; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, v.123, p. 479-487, fev. 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.

KIEBER, J. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 517-540.

LEITE, V. C. A.; HEBLING, S. A. Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. **Natureza on line**, v.5, n.2, p.55-62. 2007. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>>. Acesso em: 15 mai. 2010.

MELLO, C. M. C. **Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado**. 2000, 48 p. Dissertação (Mestrado em Biologia). - Universidade de Brasília, Brasília-DF.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: Ambiente e Flora**. Embrapa - CPAC, 1ª ed. Planaltina-GO. 1998. p.289-556.

MIYOSHI, K., MII, M. Phytohormone pré-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 63, n. 3-4, 1995, p. 263-267.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.72-76, 2008.

MULLER, T. S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimatação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 252-254, jul. 2007

MURPHY, A. Auxina: o hormônio do crescimento. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M. A. de; REZENDE, J. C. de; ARAÚJO, A. G. de; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.211-216, abr./jun., 2009.

PEDROZA-MANRIQUE, J.; FERNÁNDEZ-LIZARAZO, C.; SUÁREZ-SILVA, A. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.41, p.838-843, nov./dez. 2005.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA JUNIOR, E. J.; MUNARIN, K. de O.; SILVA, H. M. da; SOARES, J. S. Levantamento das espécies de orquídeas nativas de uma porção de mata ciliar do Rio Dourados-MS. In: 56º Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. Sociedade Botânica do Brasil, 2005. p.1-1.

REZENDE, J. C. de; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; SANTOS, F. C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. **Agrarian**, v.2, n.3, p.99-114, jan./mar. 2009.

ROSA, F. A. F. da. **Síntese e avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal de novos compostos indólicos derivados do safrol e relacionados ao ácido indol-3-acético**. 2002. 144f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

SOARES, J. S.; **Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores hormonais e água de coco**. 2010. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

SOUTO, J. de S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. de M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.2, p.179-185, abr./jun. 2010.

STANCATO, G. C., ABREU, M. F., FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.51-57, 2008.

SUZUKI, R. M.; FERREIRA, W. de M. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. In: BARBOSA, L. M; SANTOS JUNIOR, N. A. dos, orgs. **A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**. São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, 2007. p.655-659.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.