

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E CRESCIMENTO
INICIAL DE *Cattleya nobilior* RCHB.F (ORCHIDACEAE)**

MARICHEL CANAZZA DE MACEDO

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013**

**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E CRESCIMENTO INICIAL
DE *Cattleya nobile* RCHB.F (ORCHIDACEAE)**

MARICHEL CANAZZA DE MACEDO
Bióloga/Mestre

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

**Tese 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 Doutora**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

M141g Macedo, Marichel Canazza de.
Germinação assimbiótica de sementes e crescimento inicial de plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f. (Orchidaceae) / Marichel Canazza de Macedo. – Dourados, MS : UFGD, 2013.
72 f.

Orientadora: Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Orquídea. 2. Germinação assimbiótica. I. Rosa, Yara Brito Chaim Jardim. Título.

CDD: 584.15

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA E CRESCIMENTO INICIAL DE *Cattleya nobilior* Rchb. f. (ORCHIDACEAE)

por

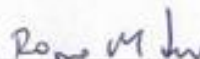
Marichel Canazza de Macedo

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

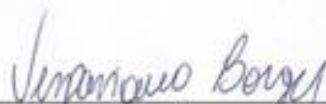
Aprovada em: 25 /02/2013



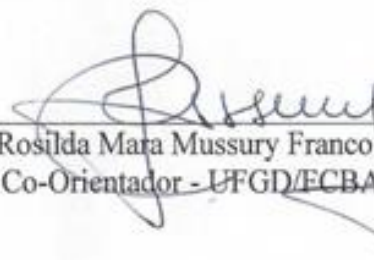
Dr.^a Silvana de Paula Quintão Scalon
Co-Orientador – UFGD/FCA



Dr. Rogério Mamoru Suzuki
Co-Orientador - Instituto de Botânica – SP



Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul



Dr.^a Rosilda Mara Mussury Franco Silva
Co-Orientador - UFGD/ECBA



Dr.^a Yara Brito Chaim Jardim Rosa
Orientadora – UFGD/FCA

Com muito carinho, dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

As palavras são poucas para agradecer a Deus por Sua infinita bondade, misericórdia e amor ao conceder-me a vida nesta família maravilhosa que tenho;

A toda equipe da Universidade Federal da Grande Dourados e do Programa de Pós-Graduação pela oportunidade concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa;

A toda equipe da Fundação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro;

À professora Yara por ter acreditado em mim e concedido-me a oportunidade de realização deste trabalho orientando e proporcionando-me tantos ensinamentos e, principalmente, pela grande paciência que tem tido comigo.

À professora Mara e ao pesquisador Rogério pela co-orientação, auxílio e companheirismo;

Aos professores Vespasiano e Silvana por fazerem parte da banca e por todo o auxílio oferecido;

Aos meus pais Benjamim e Marta pelo amor, carinho, educação e apoio que me ofereceram em todos os momentos.

Às minhas irmãs Jussara e Raquel pelo companheirismo, paciência e momentos de diversão.

Ao meu noivo Thiago pelo amor oferecido, por ser meu amigo, companheiro, com quem me divirto e divido minhas angústias, alegrias, reclamações e principalmente as pretensões da minha vida futura. Agradeço também à família do Thiago pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Shara, Gisele, Nilda, Nicholas, Camila, Alinne e Aline, Patrícia, Igor, Elissanda, pela amizade, companheirismo, conselhos, auxílio nas avaliações, pela diversão e principalmente pelo carinho oferecido.

À senhora Veni, minha vizinha e amante de orquídeas, por ter me fornecido cápsulas de *Cattleya nobilior*.

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

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1 - ARMAZENAMENTO, GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE).....	7
RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
1 - INTRODUÇÃO	9
2 - MATERIAL E MÉTODOS	12
EXPERIMENTO 1 - Efeito dos meios nutritivos, da concentração de ágar e do tempo de cultivo na germinação de sementes de <i>Cattleya nobilior</i>	15
EXPERIMENTO 2 - Efeito do tempo de armazenamento, meios nutritivos e concentrações de ágar na germinação de sementes de <i>Cattleya nobilior</i>	19
EXPERIMENTO 3 - Efeito de tratamento pré-germinativo na germinação de sementes de <i>Cattleya nobilior</i>	25
EXPERIMENTO 4 - Efeito do meio nutritivo e da concentração de ágar no desenvolvimento de protocormos de <i>Cattleya nobilior</i>	29
3 - CONCLUSÕES	35
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE)	41
RESUMO	41
ABSTRACT.....	42
EXPERIMENTO 1-Efeito da água de coco no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cattleya nobilior</i>	43
1 - INTRODUÇÃO.....	43
2 - MATERIAL E MÉTODOS	45
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4 – CONCLUSÃO	54
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

EXPERIMENTO 2 - Efeito de reguladores de crescimento no cultivo <i>in vitro</i> de plantas de <i>Cattleya nobile</i>	58
1 - INTRODUÇÃO.....	58
2 - MATERIAL E MÉTODOS	60
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4 - CONCLUSÕES	69
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1 - ARMAZENAMENTO, GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE).....	7
QUADRO 1. Constituintes dos meios nutritivos utilizados na germinação de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	13
QUADRO 2. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	16
QUADRO 3. Efeito conjunto do tempo de cultivo e do meio de cultura sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	17
QUADRO 4. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	20
QUADRO 5. Efeito conjunto do tempo de armazenamento das sementes (TA), do meio nutritivo e da concentração de ágar sobre a porcentagem de germinação de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	21
QUADRO 6. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. em função da concentração e do tempo de imersão das sementes em ácido giberélico . UFGD, Dourados – MS, 2013.	26
QUADRO 7. Resumo da análise de variância do desenvolvimento de protocormos de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. avaliados aos 90 dias após a semeadura. UFGD, Dourados – MS, 2013.	30
CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE)	41
QUADRO 1. Resumo das análises de variância da massa fresca (MF), porcentagem da massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR), massa seca (MS), porcentagem de massa seca da parte aérea (%MSPA) e das raízes (%MSR), de brotos de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.	47
QUADRO 2. Resumo das análises de variância do comprimento da parte aérea (CPA) e as raízes (CR), do número de folhas (NF) e de raízes (NR) dos brotos (NB) e número total de brotos por planta de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.....	51
QUADRO 3. Resumo das análises de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB), número de brotos (NB) e de folhas por brotos (NF), porcentagem de folhas vivas (%FV) e mortas (%FM) por broto, comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR) do broto, número de raízes por broto (NR), porcentagem de brotos vivos (%BV) e mortos (%BM) por planta, massa fresca dos brotos (MF),	

porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR) dos brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - ARMAZENAMENTO, GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE).....	7
FIGURA 1. a) Fruto de <i>Cattleya nobilior</i> barra = 1,0 cm. b) Flores de <i>C. nobilior</i> . Barra = 1,0 cm. UFGD, Dourados-MS, 2013.....	12
FIGURA 2. a) Frasco plástico transparente utilizado para a germinação <i>in vitro</i> de <i>Cattleya nobilior</i> barra = 2,0 cm. b) Sementes germinadas de <i>Cattleya nobilior</i> barra = 0,2 mm. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	16
FIGURA 3. Efeito conjunto da concentração de ágar e do meio de cultura sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. armazenadas por a) 90 dias e b) 210 dias. KC = Knudson C, MS= Murashige e Skoog, MS ½= Murashige e Skoog com metade da concentração de nutrientes, VW = Vacin e Went. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	22
FIGURA 4. Efeito conjunto da concentração de giberelina e do tempo de imersão das sementes sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	22
FIGURA 5. Estágios de desenvolvimento de protocormos de <i>Cattleya nobilior</i> . a) estágio 1 barra = 1,5 mm. b) estágio 2 barra = 3,0 mm. c) estágio 3 barra = 3,0 mm. d) estágio 4 barra = 3,0 mm. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	30
FIGURA 6. Efeito do meio nutritivo e da concentração de ágar sobre a porcentagem de protocormos em estágio 01 (%P1) (a), em estágio 02 (%) (b) e em estágio 03 (%P3) (c) e da concentração de ágar sobre a porcentagem de protocormos em estágio 04 (%P4) obtida em meio MS ½ (d) de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb. f. Dourados- MS, UFGD, 2013.....	32
CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE <i>Cattleya nobilior</i> RCHB.F. (ORCHIDACEAE)	41
FIGURA 1. a) Planta de <i>Cattleya nobilior</i> com flores barra = 2,0 cm. b) Brotos de plantas de <i>C. nobilior</i> cultivados <i>in vitro</i> barra = 2,0 cm. c) Plantas de <i>C. nobilior</i> produzidas aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS enriquecido com 25% de água de coco barra = 2,0 cm. d) Plantas de <i>C. nobilior</i> produzida aos 180 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS enriquecido com 25% de água de coco barra = 2,0 cm.....	46
FIGURA 2. Efeito conjunto da água de coco e do tempo de cultivo sobre a massa fresca (a), massa seca (b), porcentagem de massa fresca da parte aérea (c) e das raízes (d) e porcentagem de massa seca da parte aérea (e) e das raízes (f) de brotos de <i>Cattleya nobilior</i> Rchb. f. UFGD, Dourados-MS,	

	2013.....	50
FIGURA 3.	(a) número de raízes dos brotos; (b) comprimento das raízes dos brotos; (c) comprimento da parte aérea dos brotos e (d) número total de brotos de <i>Cattleya nobile</i> Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.....	52
FIGURA 4.	Porcentagem de sobrevivência (%SOB) de <i>Cattleya nobile</i> Rchb.f. observada em função das concentrações de ANA e BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	63
FIGURA 5.	Número de brotos de <i>Cattleya nobile</i> Rchb.f. observado em função das concentrações de ANA e BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	64
FIGURA 6.	Número de folhas (NFP), porcentagem de folhas vivas (%FV) e mortas (%FM) por. UFGD, Dourados – MS, 2013. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Tukey, 5% de probabilidade).....	65
FIGURA 7.	Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e número de raízes (NR) por broto de <i>Cattleya nobile</i> Rchb.f. observados (A) em função das concentrações de ANA; (B) em função das concentrações de BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	66
FIGURA 8.	Massa fresca (MF), porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR) de brotos de <i>Cattleya nobile</i> Rchb.f. observados em função das concentrações de BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.....	68

RESUMO

MACEDO, Marichel Canazza de. **Germinação assimbiótica e crescimento inicial de *Cattleya nobile* Rchb.f. (Orchidaceae)**. Orientadora: Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Co-orientadores: Rogério Mamoru Suzuki, Rosilda Mara Mussury Franco Silva.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, localizada no município de Dourados – MS, durante o período de setembro de 2009 a maio de 2012. Objetivou-se avaliar: (1) a germinação assimbiótica de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobile* Rchb. f. em função do tempo de armazenamento das sementes (90 e 210 dias), dos meios nutritivos (MS, MS ½, K e VW), da concentração de ágar (0; 2; 4; 6 e 8 g L⁻¹) e de tratamento pré-germinativo das sementes por 30, 60 e 120 minutos com giberelina (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹); e (2) o efeito da água de coco (0; 5; 10; 20 e 25%) e dos reguladores de crescimento BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) no cultivo *in vitro* de plantas de *C. nobile*. Foram utilizados como materiais de estudo, sementes de *C. nobile*, obtidas a partir de polinização natural e plantas obtidas a partir de germinação assimbiótica no Laboratório de Cultivo *in vitro*. Houve maior germinação das sementes nos meios MS ½, MS ou VW, independente da concentração de ágar e do uso de giberelina. Aos 210 dias de armazenamento, a germinação reduziu para 50%. Os meios MS e MS ½ possibilitaram o desenvolvimento de plantas inteiras após 90 dias de cultivo *in vitro*. A adição de água de coco (25%) resultou em maiores valores de massa fresca e seca e no maior comprimento da parte aérea das plantas. Por outro lado, na ausência de água de coco, aos 90 dias de cultivo, houve maior produção de raízes, e aos 180 dias de cultivo, houve elevada produção de brotos e maior comprimento das raízes. Não houve efeito dos reguladores de crescimento sobre o número de brotos e raízes, comprimento da parte aérea e massa fresca das plantas. No entanto, a sobrevivência das plantas e a porcentagem de massa fresca da parte aérea foi maior com a adição de 4,0 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que o maior número de folhas foi observado com a adição de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e o comprimento das raízes foi maior na presença de 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

Palavras – chave: Orquídea, germinação *in vitro*, meio de cultura, cultivo *in vitro*, água de coco, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

MACEDO, Marichel Canazza de. **Asymbiotic germination and initial growth of *Cattleya nobile* Rchb.f. (Orchidaceae)**. Orientadora: Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Co-orientadores: Rogério Mamoru Suzuki, Rosilda Mara Mussury Franco Silva.

This work was developed in the Laboratório de Cultivo *in vitro* of Faculdade de Ciências Agrárias of Universidade Federal da Grande Dourados, located in Dourados – MS, during the period of September 2009 to May 2012. This study was conducted with the objective of evaluating: (1) asymbiotic seed germination and protocorm development of *Cattleya nobile* Rchb.f. as a function of seed time storage (90 or 210 days), nutrient media (MS, ½ MS, K and VW), agar concentration (0; 2; 4; 6 and 8 g L⁻¹) and pre-germinating seed treatment for 30, 60 and 120 minutes in gibberellin (0; 0.5; 1.0; 2.0; and 4.0 mg L⁻¹); (2) the effect of coconut water (0; 5; 10; 20 and 25%) and growth regulators BAP (0.0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and NAA (0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) on *in vitro* culture of plants of *C. nobile*. Seeds from natural pollination and plants obtained from asymbiotic germination in the laboratory were used as study material. It was observed a high germination on ½ MS, MS or VW media, regardless agar concentration and gibberellin. At 210 days of storage, the germination decreased to 50%. MS and ½ MS media enabled the development of whole plants after 90 days of *in vitro* culture. The addition of 25% coconut water resulted in higher values of fresh and dry mass and greatest length of shoots. On the other hand, in the absence of coconut water, at 90 days of culture, there was a greater production of roots, and at 180 days of culture, there was high shoot and root production and greater root length. No effect of growth regulators was observed on shoots and roots number, shoot length and fresh weight of the plants. On the other hand, the survival and the percentage of fresh weight of aerial part increased with the addition of 4.0 mg L⁻¹ BAP, while the larger number of leaves was observed with the addition of NAA 0.5 mg L⁻¹ and root length was higher in the presence of NAA 2.0 mg L⁻¹.

Key words: Orchid, *in vitro* germination, culture medium, *in vitro* culture, coconut water, growth regulators.

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de Angiospermas, sendo constituída por aproximadamente 35.000 espécies e 800 gêneros, que se distribuem no planeta, excetuando-se as regiões polares e desérticas (DRESSLER, 1993).

A produção comercial de orquídeas está voltada principalmente para o mercado florista, e devido à crescente expansão do mercado, essa atividade tem se transformado em uma indústria lucrativa na Europa, Havaí, Austrália, Tailândia, Japão, Singapura, Sri Lanka e Quênia (LUAN et al., 2006; MARTIN e MADASSERY, 2006). As orquídeas também ocupam um importante papel na produção de cosméticos, na obtenção de alcalóides utilizados na farmacologia e na produção de alimentos como a baunilha (SEQUEIRA, 2007; FARIA et al., 2012).

Para a obtenção de mudas, o uso das técnicas de cultura de tecidos tem tornado a produção comercial dessas espécies cada vez mais expressiva ao possibilitar a multiplicação rápida e massiva de genótipos pertencentes, principalmente, aos gêneros *Dendrobium*, *Cymbidium* e *Phalaenopsis* (KUMARIA e TANDON, 2001; KUEHNLE et al., 2003).

Entretanto, várias espécies nativas de interesse comercial como *Cattleya nobilior* Rchb.f. tem sido alvo de coletas para comercialização, que associadas aos contínuos desmatamentos, têm reduzido a ocorrência das populações dessa espécie (BIANCHETTI, 2007). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2008), *C. nobilior* não é considerada ameaçada de extinção, porém encontra-se na lista das espécies cujas informações são ainda deficientes não permitindo enquadramento com segurança na condição de ameaçada. Dessa forma, a preocupação com o *status* de conservação da espécie aumenta em virtude da escassez de informações sobre sua propagação.

A obtenção de mudas de orquídeas a partir da sementeira *in vitro* é um processo fácil e eficiente para a produção uniforme e rápida que resulta em elevados percentuais de germinação quando comparada à germinação sob condições naturais, a qual é dependente de fungos micorrízicos, constituindo, dessa maneira, uma alternativa viável e relevante tanto do ponto de vista comercial quanto ambiental (MARTINI et al., 2001; STANCATO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2006; FARIA et al., 2012).

A escolha apropriada do meio nutritivo é um dos principais fatores no sucesso da cultura assimiótica, uma vez que as respostas germinativas variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, que podem ser específicas nas diferentes etapas do desenvolvimento (DAMON et al., 2004; STEWART e KANE, 2006; TEMJENSANGBA e DEB, 2006; PAUL et al., 2012).

A consistência dos meios de cultura também deve ser considerada, já que a difusão dos nutrientes para a semente aumenta ou diminui em função da concentração do agente geleificante utilizado (FARIA et al., 2012).

Além desses fatores, tratamentos pré-germinativos com soluções de giberelina têm sido empregados com o objetivo de acelerar e uniformizar a germinação *in vitro* de algumas espécies de orquídeas (MIYOSHI e MII, 1995; SANTOS et al., 2007; MACEDO et al., 2011)

O uso de sementes na produção comercial de orquídeas, quando armazenadas, tem como vantagem a produção escalonada de mudas em diferentes períodos do ano (CARVALHO, 2006). Nesse sentido, o estabelecimento de protocolos de armazenamento é necessário (SEATON e PRITCHARD, 2011) para a manutenção da viabilidade e germinabilidade das sementes.

Após a germinação das sementes, várias etapas de cultivo *in vitro* são necessárias para que as plantas formadas sejam aclimatizadas e, posteriormente comercializadas, sendo necessário, dessa forma, que os meios de cultura utilizados sejam enriquecidos com substâncias que estimulem o crescimento (KRAPIEC et al., 2003; COSTA et al., 2009).

A suplementação do meio de cultura com aditivos orgânicos como a água de coco (endosperma líquido de *Cocos nucifera* L.) tem proporcionado efeitos benéficos no crescimento *in vitro* de diversas espécies de orquídeas, além de ser um procedimento simples e acessível aos produtores (ICHIHASHI e ISLAN, 1999; VENTURA, 2007; VIEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012).

Em contrapartida, o uso de auxinas como o ácido naftalenoacético (ANA) e citocininas como a 6-benzilaminopurina (BAP), tem sido relatado por vários autores para estimular a proliferação de brotos de orquídeas bem como para acelerar o crescimento em altura e a formações de raízes (PEREZ et al., 1999; BHADRA e HOSSAIN, 2003; BASKER e BAI, 2006; GIATTI e LIMA, 2007).

Em virtude da escassez de trabalhos relacionados às exigências necessárias para o processo germinativo das sementes e crescimento inicial *in vitro*, o estudo

relacionado às técnicas de multiplicação *in vitro* de *C. nobilior* é necessário para a manutenção, repovoamento e comercialização dessa espécie.

Este trabalho foi desenvolvido levando-se em consideração que o tempo de armazenamento e de cultivo *in vitro* das sementes, a composição dos meios nutritivos, a concentração de ágar e tratamentos pré-germinativos interferem na germinação assimbiótica das sementes e no desenvolvimento inicial de protocormos de *C. nobilior* e a ação de reguladores de crescimento e compostos orgânicos interferem no crescimento inicial de plantas de *C. nobilior*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.61-67, 2006.
- BASKER, S.; BAI, V. N.; Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D.Don) Schltr. via pseudobulb segment cultures. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v.6, p.31-35, 2006.
- BHADRA, S. K.; HOSSAIN, M. M. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. **Plant tissue culture**, v.13, n.2, p.167-171, 2003. Disponível em: < <http://www.bapctb.org/ptc/abstracts.asp?YEAR=247> > Acesso em: 25 jan. 2013.
- BIANCHETTI, L. B.; *Cattleya nobilior* Rchb.f. **Heringeriana**, Brasília, v.1, n.1, p.9-10, 2007.
- CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 69 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. (ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p.351-370.
- DAMON, A.; AGUILAR-GUERRERO, E.; RIVERA, L.; NIKOLAEVA, V. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de três espécies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. **Revista Chapingo: Série Horticultura**, v.10, n.2, p.195-203, 2004. Disponível em: < http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?anio=2004&vol=X&num=2&id_rev=1 > Acesso em: 12 jan. 2013.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides press, 1993. 314p
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012. 124p.
- 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**, Lavras, v.31, n.5, p.1279-1285, 2007.
- GONÇALVES, L. M.; PRIZÃO, E. C.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of *Hadrolaelia purpurata* (= *Laelia purpurata*) and *Encyclia randii* orchids. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.34, n.4, p.459-463, 2012.

ICHIHASHI, S.; ISLAM, M. O. Effect of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Kyoto, v.68, p.269-274, 1999.

KRAPIEC, P. V.; MILANEZE, M. A.; MACHADO, M. F. P. S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v.25, n.1, p.179-182, 2003.

KUEHNLE, A. R.; AMORE, T. D.; MERSINO, E.; SEWAKE, K.; WAGONER, T. What do *Dendrobium* orchids producers want in their potted flowers?- Results of a grower survey. **CTAHR**, 2003. Disponível em: <http://www.ctahr.hawaii.edu>. Acesso: 10 jan. 2013.

KUMARIA, S.; TANDON, P. Orchids: the World's most wondrous plants. In: PATHAK, P.; SEHGAL, R. N.; SHEKHAR, N.; SHARMA, M.; SOOD, A. **Orchids: science and commerce**. 1.ed. India, Bishen Singh Mahendra Pal Sing, 2001, p.17-28.

LUAN, V. Q.; THIEN, N. Q.; KHIEM, D. V.; NHUT, D. T. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. **Proceedings of international Workshop on Biotechnology in Agriculture**, Nong Lam University Ho Chi Minh City, October 20-21, p.175-177, 2006.

MACEDO, M. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; HOFFMANN, N. T. K.; SILVA, N. V.; ROSA, R. J. M. Efeito do ácido giberélico e do tempo de embebição na germinação assimbiótica de *Brassavola cebolleta* Rchb. f. In: I ENCONTRO SOBRE ORQUÍDEAS NATIVAS E ADAPTADAS AO CERRA BRASILEIRO, 2011, Chapadão do Sul. **Resumos...**Chapadão do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

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

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. Instrução normativa n. 6 de 23 de setembro de 2008. Disponível em: <
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instruca06.pdf>. > Acesso: 14 jan. 2013

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

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a

threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v.2012, p.1-12, 2012. Disponível em: < <http://aobpla.oxfordjournals.org/content/2012/plr032.full> >. Acesso: 2 fev. 2013.

PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R.; MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.551-555, 1999. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/PeresJPPP1.PDF> >. Acesso em: 14 jan. 2013.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **Cesumar**, Maringá, v.9, n.1, p.7-12, 2007.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana**, v.11, n.3, p.349-353, 2011. Disponível em: < [http://lankesteriana.org/lankesteriana/LANKESTERIANA%2011\(3\)%2021_Lankesteriana%2011\(3\)%20Seaton&Pritchard.pdf](http://lankesteriana.org/lankesteriana/LANKESTERIANA%2011(3)%2021_Lankesteriana%2011(3)%20Seaton&Pritchard.pdf) > Acesso: 26 jan. 2013.

SEQUEIRA, L. G. C. C. **Avaliação de diferentes substratos e da inoculação de fungos rizotonióides no crescimento inicial de *Hadrolaelia perrinii***. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônômico, Campinas -SP.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination na *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006.

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocormo-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.223-228, 2006. Disponível em:< <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7757> > Acesso: Acesso: 13 abr. 2013.

VENTURA, G. M.; **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. 2007. 110f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T.; AGUIAR, R. S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48-52, 2009.

CAPÍTULO 1

**ARMAZENAMENTO, GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES E
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE *Cattleya nobilior* RCHB.F.
(ORCHIDACEAE)**

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a germinação assimbiótica de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobilior* em função do tempo de armazenamento das sementes, dos meios nutritivos, da concentração de ágar e de tratamento pré-germinativo com giberelina. Para tanto foram desenvolvidos quatro experimentos independentes. No primeiro trabalho foi avaliado o efeito de quatro meios nutritivos (MS, MS ½, KC e VW), cinco concentrações de ágar (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹) e dois tempos de cultivo *in vitro* (30 e 60 dias) sobre a porcentagem de germinação (%G). No segundo experimento, foi avaliado o efeito de quatro meios nutritivos (MS, MS ½, KC e VW) e cinco concentrações de ágar (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹) sobre a %G de sementes armazenadas por 90 e 210 dias. No terceiro experimento, foi avaliado o efeito de quatro meios nutritivos (MS, MS ½, KC e VW) e cinco concentrações de ágar (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹) sobre a porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P1), 2 (%P2), 3 (%P3) e 4 (%P4). No quarto experimento, foi avaliado o efeito da concentração de GA₃ (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e do tempo de imersão das sementes (30, 60 e 120 minutos) sobre a %G. Os maiores valores de %G foram observados nos meios MS ½, MS ou VW, independente da concentração de ágar. A %G das sementes reduziu para 50% aos 210 dias de armazenamento. Os meios MS e MS ½ possibilitaram o desenvolvimento de protocormos até o estágio 4, em 90 dias de cultivo *in vitro*. O uso de GA₃ como tratamento pré-germinativo não influenciou a germinação de sementes de *Cattleya nobilior*.

Palavras - chave: Orquídea, germinação *in vitro*, meio de cultura, conservação.

ABSTRACT

The present work was conducted with the objective of evaluating *Cattleya nobilior* asymbiotic seed germination and protocorm development as a function of the storage time of seeds, nutrient media, agar concentration and pre-germination treatment with gibberellin. For this purpose, four independent experiments were developed. In the first study, it was evaluated the effect of four nutrient media (MS, ½ MS, KC and VW), five agar concentrations (0; 2; 4; 6 and 8 g L⁻¹) and two *in vitro* culture periods (30 and 60 days) on the germination percentage (%G). In the second experiment, it was evaluated the effect of four nutrient media (MS, ½ MS, KC and VW) and five agar concentrations (0; 2; 4; 6 and 8 g L⁻¹) on the %G of seeds stored for 90 and 210 days. In the third experiment, it was evaluated the effect of four nutrient media (MS, ½ MS, KC and VW) and five agar concentrations (0; 2; 4; 6 and 8 g L⁻¹) on the percentage of protocorms at stage one (%P1), two (%P2), three (%P3) and four (%P4). In the fourth experiment, it was evaluated the effect of GA₃ concentration (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and the immersion time of the seeds (30, 60 and 120 minutes) on the %G. The highest values of %G were observed on ½ MS medium, MS or VW, regardless the agar concentration. The %G decreased to 50% after 210 days of storage. The media MS and ½ MS enabled the protocorm development at stage four during the *in vitro* culture for 90 days. The use of GA₃ as a pre-germination treatment did not affect *Cattleya nobilior* seed germination.

Key words: Orchid, *in vitro* germination, culture medium, conservation.

1 - INTRODUÇÃO

As orquídeas constituem uma das maiores famílias de Angiospermas e caracterizam-se, entre vários aspectos, por apresentar um intrincado mecanismo reprodutivo, em que a maior parte da energia disponível para este fim é direcionada à produção de flores e atração de polinizadores (McKENDRICK et al., 2000; BHADRA e HOSSAIN, 2003).

Em consequência disso, as sementes produzidas por estas espécies são minúsculas e apresentam poucas reservas nutritivas. Sob condições naturais, a germinação e o desenvolvimento de plântulas ocorrem após o estabelecimento de associações simbióticas com fungos micorrízicos que fornecem carboidratos e nutrientes minerais e sustentam dessa forma, a germinação simbiótica (RASSMUSSEN, 2002; SAHA e RAO, 2006; RASMUSSEN e RASMUSSEN, 2007; BOLDRINI et al., 2010).

As sementes de orquídeas também podem germinar na ausência de fungos (germinação assimbiótica) sob condições assépticas, desde que cultivadas em meio de cultura contendo nutrientes minerais, carboidratos e outros compostos orgânicos (JOHNSON et al., 2011). O uso desta técnica tem possibilitado a propagação comercial de orquídeas em larga escala e contribuído também para programas de conservação de espécies em risco de extinção (STANCATO et al., 2001; PIRIA et al., 2008; FARIA et al., 2012).

Cattleya nobilior Rchb.f é uma espécie de orquídea que ocorre no Brasil, exclusivamente no bioma Cerrado, distribuindo-se nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão e Distrito Federal (BARROS et al., 2013). Trata-se de uma espécie epífita de 10-20 cm de altura que floresce nos meses de agosto a setembro, apresenta inflorescências que produzem geralmente de uma a três flores róseo-lilases, grandes e muito vistosas. Por todos esses motivos, a espécie é submetida à pressão de coleta voltada para a comercialização (POTT e POTT, 1994; BIANCHETTI, 2007).

Além disso, o *status* de conservação para a maior parte das populações de *C. nobilior* gera preocupações, uma vez que, mesmo não sendo considerada ameaçada de extinção, encontra-se na lista das espécies cujas informações são ainda deficientes, (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008). Desse modo, qualquer iniciativa

voltada para a conservação da espécie deve ser valorizada (BIANCHETTI, 2007), visto que informações sobre sua propagação são praticamente inexistentes.

A produção de mudas dessa espécie, a partir da germinação assimbiótica, é uma alternativa viável para obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo, podendo suprir, dessa maneira, a necessidade dos produtores na aquisição de mudas (ARAÚJO et al., 2006).

A escolha apropriada do meio nutritivo é um dos principais fatores no sucesso da cultura assimbiótica, uma vez que as respostas germinativas variam de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie, que podem ser específicas nas diferentes etapas do desenvolvimento (DAMON et al., 2004; STEWART e KANE, 2006; TEMJENSANGBA e DEB, 2006; PAUL et al., 2012).

De modo geral, os meios nutritivos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), KC (KNUDSON, 1946) e VW (VACIN e WENT, 1949) são os mais utilizados na germinação e no desenvolvimento de protocormos de espécies do gênero *Cattleya* (BHADRA e HOSSAIN, 2003; LAVRENTYEVA e IVANNIKOV, 2007; SUZUKI et al., 2010; JORGE et al., 2011; FARIA et al., 2012).

Ao se estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro*, a consistência dos meios de cultura também deve ser considerada, uma vez que a difusão dos nutrientes para a semente aumenta ou diminui em função da concentração do agente geleificante utilizado (FARIA et al., 2012). O ágar é um dos agentes geleificantes mais empregados no cultivo assimbiótico de orquídeas e devido ao seu elevado custo (FARIA et al., 2006; TSAI e CHU, 2008) é necessário o estabelecimento de uma concentração ideal que possibilite elevados percentuais germinativos e o desenvolvimento satisfatório das plantas.

O uso de sementes na produção comercial de orquídeas, além de constituir uma das formas mais disseminadas de multiplicação (STANCATO et al., 2001), possibilita a produção escalonada de mudas em diferentes períodos do ano, quando armazenadas (CARVALHO, 2006). Nesse sentido, o estabelecimento de protocolos de armazenamento é necessário (SEATON e PRITCHARD, 2011) para a manutenção da viabilidade e germinabilidade das sementes.

Segundo SEATON e PRITCHARD (2008), as sementes de orquídeas podem ser armazenadas em refrigeradores domésticos, desde que secas previamente ao armazenamento, entretanto, não há, na literatura, informações sobre o uso deste método para sementes do gênero *Cattleya*, bem como sua conservação ao longo do tempo.

Embora a cultura assimbiótica seja uma ferramenta para a produção massiva de mudas, a germinação de algumas espécies de orquídeas é lenta (HEW e CLIFFORD, 1993), quando comparada à germinação simbiótica na qual os fungos micorrízicos facilitam a absorção de água pela semente (YODER et al., 2000) e auxiliam o consumo de lipídios presentes na semente durante o processo germinativo (DAMON et al., 2004) tornando-o mais rápido.

O tratamento pré-germinativo das sementes em soluções de ácido giberélico (GA_3) tem sido utilizado com o objetivo de acelerar e uniformizar a germinação de sementes de orquídeas (MIYOSHI e MII, 1995; SANTOS et al., 2007; MACEDO et al., 2011), dada a sua função na ativação do crescimento vegetativo do embrião e na mobilização das reservas nutritivas durante a germinação (TAIZ e ZEIGER, 2008). A pré-imersão de sementes de *Cattleya bicolor* Lindl. por 24 h em solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 resultou em maior germinação quando comparado ao controle (SANTOS et al., 2007).

Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar a germinação assimbiótica de sementes e o crescimento inicial de protocormos de *Cattleya nobilior* em função do tempo de armazenamento das sementes, dos meios nutritivos, da concentração de ágar e de tratamentos pré-germinativos com giberelina.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado como material de estudo, sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f., provenientes de frutos oriundos de polinização natural (Figura 1a), colhidos em plantas adultas (Figura 1b) 12 meses após a identificação do sucesso feminino.

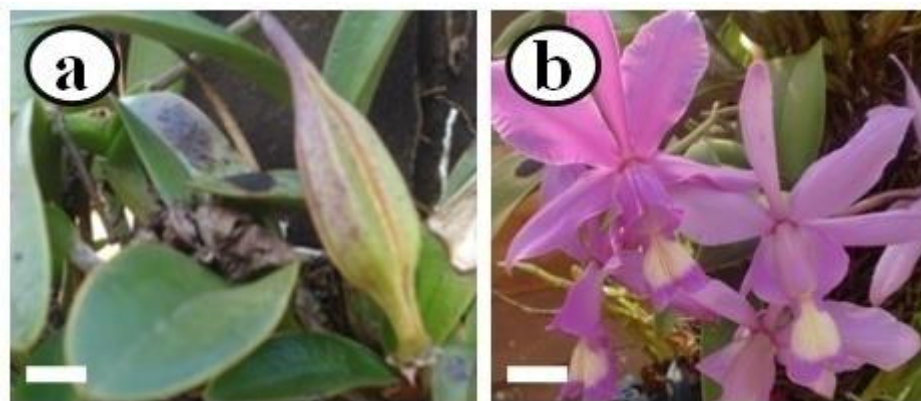


FIGURA 1. a) Fruto de *Cattleya nobilior* barra = 1,0 cm. b) Flores de *C. nobilior*. Barra = 1,0 cm. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Após serem colhidos, os frutos foram lavados com água e detergente neutro e desinfetados com álcool (70%). A seguir foram abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas, homogeneizadas, acondicionadas em recipiente desprovido de tampa e revestido internamente com papel alumínio e transferidas para dessecador, com sílica gel, por 14 dias, em condições ambientais.

Após esse período, três porções de 0,005 g de sementes, foram colocadas em tubos de ensaio e cada uma delas recebeu uma solução aquosa de 3 mL de cloreto de trifênil tetrazólio 0,5%. As suspensões de sementes foram acondicionadas em ambiente desprovido de luz sob 25 ± 2 °C. Após 24 horas as suspensões de tetrazólio foram acrescidas de 7 mL de água destilada e agitadas, sendo pipetado 1mL para identificação e contagem de sementes viáveis em câmara de Peters com o auxílio de um microscópio estereoscópico (SOARES et al., 2012a).

Foi contabilizado o número total de sementes (N°TS) e desse total foram consideradas como viáveis apenas as sementes com embriões totalmente coloridos de carmin, enquanto que as sementes com embriões incolores ou parcialmente corados e as desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis. O percentual de sementes viáveis (%SV) foi determinado pela seguinte fórmula: $\%SV = (N^\circ \text{ de sementes com embrião totalmente coloridos de carmin} \times 100) / N^\circ TS$. Para cada amostra foram realizadas três

leituras, sendo posteriormente calculada a média entre elas que resultou em 85,52% de viabilidade.

Na sequência, o restante das sementes foi dividido em duas porções de igual peso e, cada uma delas, foi embalada em papel filtro e armazenada em geladeira (4 ± 2 °C), dentro de recipiente plástico provido de tampa, por 90 ou 210 dias. Após cada período de armazenamento, três amostras de 0,005g de sementes, foram novamente submetidas ao teste de tetrazólio (SOARES et al, 2012a), sendo registradas viabilidade de 90 e 54 %, para os tempos de armazenamento de 90 e 210 dias, respectivamente.

Como meio de cultivo, foram estudados os meios KC (KNUDSON, 1946), VW (VACIN e WENT, 1949), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS $\frac{1}{2}$ (MURASHIGE e SKOOG, 1962, na metade da concentração de seus componentes) cujos constituintes são apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1. Constituintes dos meios nutritivos utilizados na germinação de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Constituintes	Meios nutritivos			
	KC (mg L ⁻¹)	VW (mg L ⁻¹)	MS (mg L ⁻¹)	MS $\frac{1}{2}$ (mg L ⁻¹)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1000,00	-	-	-
KH ₂ PO ₄	250,00	250,00	170,00	85,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,00	250,00	370,00	185,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	500,00	500,00	-	-
KNO ₃	-	525,00	1900,00	950,00
Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	200,00	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	1650,00	825,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	440,00	220,00
Mn(SO ₄).4H ₂ O	7,50	-	22,30	11,10
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30	37,30	37,25	18,60
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	28,70	28,70	27,85	13,90
H ₃ BO ₃	-	-	6,20	3,10
KI	-	-	0,83	0,40
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	0,25	0,10
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0,03	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	8,60	4,30
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	0,03	0,01
Tiamina	-	-	0,50	0,20
Ác.nicotínico	-	-	0,50	0,20
Piridoxina	-	-	0,50	0,20
Mio-Inositol	-	-	100,00	50,00
Glicina	-	-	2,00	1,00

KC (KNUDSON, 1946); VW (VACIN e WENT, 1949); MS e MS $\frac{1}{2}$ (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Para que os objetivos propostos fossem alcançados, durante o período de setembro de 2009 a fevereiro de 2012, foram conduzidos quatro experimentos independentes no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados – MS, a saber:

- 1- Efeito dos meios nutritivos, da concentração de ágar e do tempo de cultivo na germinação de sementes de *Cattleya nobile*;
- 2- Efeito do tempo de armazenamento, meios nutritivos e concentrações de ágar na germinação de sementes de *Cattleya nobile*;
- 3- Efeito de tratamento pré-germinativo na germinação de sementes de *Cattleya nobile*;
- 4- Efeito do meio nutritivo e da concentração de ágar no desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobile*.

EXPERIMENTO 1**Efeito dos meios nutritivos, da concentração de ágar e do tempo de cultivo na germinação de sementes de *Cattleya nobilior***

Os meios de cultivo KC (KNUDSON, 1946), VW (VACIN e WENT, 1949), MS e MS ½ (MURASHIGE e SKOOG, 1962) foram geleificados com 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose, tendo o pH ajustado para 5,8±0,1 com KOH (0,1M).

Como frascos de cultivos foram utilizados recipientes de plástico transparente, providos de tampa rosqueável, com capacidade para 50 mL que receberam 10 mL de um dos meios de cultura estudados (Figura 2a). A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a solidificação, os recipientes contendo os meios de cultura foram transferidos para câmara de fluxo laminar vertical, previamente desinfetada com lâmpada germicida, para a realização da semeadura *in vitro*.

Sob condições assépticas, 0,05 g de sementes armazenadas por 90 dias e com viabilidade de 90%, foram embebidas em água destilada estéril por 15 minutos. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfetadas por 15 minutos com uma solução composta por 15 mL de hipoclorito de sódio comercial e 100 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem as sementes receberam 100 mL de água destilada estéril e, 200 µL dessa suspensão de sementes, foram inoculados em cada frasco de cultivo. A seguir, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 µmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, permanecendo nessas condições por 30 ou 60 dias.

Aos 30 e 60 dias de cultivo, três frascos de cada tratamento foram abertos e, em cada frasco foram adicionados 10 mL de água destilada. Após a agitação manual a suspensão de sementes foi vertida em placa de Petri e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, contou-se o número total de sementes (N°TS) e o número de sementes com embriões clorofilados (N°SEC) (Figura 2b). A porcentagem de germinação foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: % Germinação = [(N°SEC x 100)/ N°TS].

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 4x5x2 (quatro meios de cultura, cinco concentrações de ágar bacteriológico e dois tempos de cultivo) com três repetições constituídas de um frasco de cultivo cada. Os dados foram submetidos à análise de variância com a utilização do aplicativo SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010). As médias relativas aos tempos de cultivo foram comparadas pelo teste t de Student, enquanto que aquelas relativas aos meios de cultivo foram comparadas pelo teste de Tukey, ambas até o nível de 5% de probabilidade e, às concentrações de ágar foram ajustadas curvas de regressão.

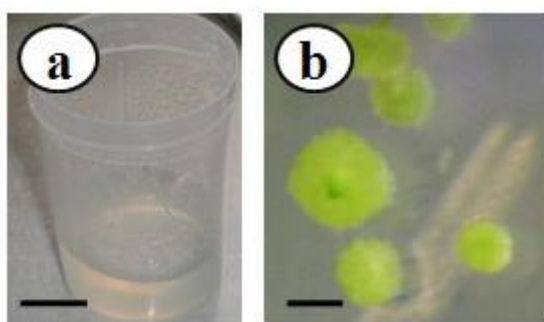


FIGURA 2. a) Frasco plástico transparente utilizado para a germinação *in vitro* de *Cattleya nobilior* barra = 2,0 cm. b) Sementes germinadas de *Cattleya nobilior* barra = 0,2 mm. UFGD, Dourados – MS, 2013.

O tempo de cultivo e os meios de cultura atuaram significativamente ($p < 0,01$) sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de *C. nobilior*, não sendo registrado efeito isolado ($p > 0,05$) das concentrações de ágar sobre esta variável. Efeito significativo ($p < 0,05$) também foi observado na interação entre tempo de cultivo e meio de cultura, entretanto não foram observados efeitos significativos ($p > 0,05$) para as demais combinações estudadas (Quadro 2).

QUADRO 2. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

F.V	G.L	Q.M
TC	1	931,33**
Meio	3	546,14**
Ágar	4	56,11 ^{ns}
TC x Meio	3	278,53*
TC x Ágar	4	119,86 ^{ns}
Meio x Ágar	12	158,18 ^{ns}
TC x Meio x Ágar	12	91,33 ^{ns}

Erro	40	87,51
CV (%)	-	11,18
Média geral	-	83,65%

** = significativo a 1% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} = não significativo

As sementes de *C. nobilior* germinaram em todos os meios de cultura estudados e, independentemente do tempo de cultivo, das concentrações de ágar e dos meios nutritivos utilizados, a %G foi superior a 70 % (Quadro 3).

Houve variação na germinação de *C. nobilior* nos meios nutritivos em função do tempo de cultivo. Quando as sementes foram cultivadas por 30 dias, não houve diferença na %G obtida nos diferentes meios, entretanto, aos 60 dias de cultivo, houve maior germinação nos meios MS ½, VW e MS e menor germinação no meio KC, estatisticamente igual ao MS e VW (Quadro 3).

QUADRO 3. Efeito conjunto do tempo de cultivo e do meio de cultura sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Tempo de cultivo	KC	MS	MS ½	VW
30	87,1Aa	81,7Aa	91,1Aa	88,1Aa
60	70,2Bb	79,9Aab	90,2Aa	80,5Aab

Letras maiúsculas comparam médias na coluna (*t* de Student a 5% de probabilidade).

Letras minúsculas comparam médias na linha (Tukey a 5% de probabilidade).

KC (KNUDSON, 1946); VW (VACIN e WENT, 1949); MS e MS ½ (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Os menores valores de %G observados no meio KC, aos 60 dias de cultivo, devem-se, provavelmente, ao maior esgotamento de nutrientes deste meio de cultivo quando comparado aos demais. Além disso, a maior %G de *C. nobilior* observada nos meios MS ½, MS e VW, aos 60 dias de cultivo, também pode estar relacionada à maior concentração de potássio desses meios quando comparada à do meio KC (Quadro 1).

PEDROZA-MANRIQUE e MICAN-GUTIÉRREZ (2006) também obtiveram maior %G de sementes de *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f, após 45 dias de cultivo, quando utilizaram meio de cultura com maior concentração de potássio (0,4 g L⁻¹), sugerindo que a espécie apresenta elevada demanda por este nutriente durante a germinação.

Resultados semelhantes foram observados para outras espécies do gênero *Cattleya*. Para *Cattleya bicolor* Lindl., os meios de cultura MS e VW também proporcionaram os maiores valores de %G de sementes (60,8 e 66,8%, respectivamente) que o meio KC (48,5%), após 25 dias de cultivo (SUZUKI et al., 2010). Para sementes

de *C. warnerii* T. Moore, após 20 dias de cultivo, a maior %G foi observada nos meios MS ½ e MS (86 e 88%, respectivamente) e, os menores valores, nos meios VW e K (46 e 24%, respectivamente) (JORGE et al., 2011).

Sementes de *C. aurantiaca* (Bateman ex Lindley) P.N Don germinaram satisfatoriamente em meio KC apresentando 91,9% de germinação, mesmo após 120 dias de cultivo (DAMON et al., 2004). Para a germinação de sementes de *C. aelandiae* Lindl., *C. bowringiana* Veitch, *C. granulosa* Lindl., *C. intermedia* Graham. ex Hooker, *C. perviciliana* O'Brien, LAVRENTYEVA e IVANNIKOV (2007), fazem uso de meio de cultura KC enriquecido pela adição de 2 mg L⁻¹ de peptona, 50mg L⁻¹ de potássio e 1 mg L⁻¹ de carvão ativado, evidenciando a importância do potássio no processo de germinação de sementes do gênero *Cattleya*.

Os resultados observados nos trabalhos relacionados ao gênero *Cattleya* em relação à germinação de suas sementes permitem inferir que os efeitos do meio de cultura sobre a germinação das sementes podem variar consideravelmente entre espécies de um mesmo gênero e em função do tempo de cultivo.

Embora o meio KC tenha resultado em decréscimo da %G de *C. nobilior* após 60 dias de cultivo (Quadro 3), o seu emprego também pode ser recomendado para a germinação desta espécie, uma vez que foram obtidos, em média, 70% de germinação.

No entanto, como pôde ser observado, as sementes de *C. nobilior* germinam satisfatoriamente em até 30 dias de cultivo em todos os meios nutritivos estudados (KC, VW, MS e MS ½), independentemente da concentração de ágar.

EXPERIMENTO 2

Efeito do tempo de armazenamento, meios nutritivos e concentrações de ágar na germinação de sementes de *Cattleya nobilior*

Sob condições assépticas, 0,05g de sementes armazenadas por 90 e 0,10 g de sementes armazenadas por 210 dias (com viabilidade de 90 e 54%, respectivamente) foram embebidas em água destilada estéril por 15 minutos. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfetadas por 15 minutos com uma solução composta por 15 mL de hipoclorito de sódio comercial e 75 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplex lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Na sequência do descarte da água de lavagem, as sementes receberam 100 mL de água destilada estéril e, 200 μ L dessa suspensão de sementes, foram inoculados em cada frasco de cultivo.

Como frascos de cultivos foram utilizados recipientes de plástico transparente, providos de tampa rosqueável, com capacidade para 50 mL que receberam 10 mL de um dos meios de cultura estudados. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Logo depois da solidificação, os recipientes contendo os meios de cultura foram transferidos para ambiente asséptico para a realização da semeadura *in vitro*.

Foram estudados os meios de cultivo KC (KNUDSON, 1946), VW (VACIN e WENT, 1949), MS e MS $\frac{1}{2}$ (MURASHIGE e SKOOG, 1962), geleificados com 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Os meios KC e VW foram acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose e os meios MS e MS $\frac{1}{2}$ foram acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, tendo o pH ajustado para 5,8 \pm 0,1 com KOH (0,1M).

Realizada a semeadura, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 μ mol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Aos 30 dias de cultivo foi avaliada a germinação. Para tanto, foram adicionados em cada frasco, 10 mL de água destilada e, em seguida a agitação manual, a suspensão de sementes foi vertida em placas de Petri. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, contou-se o número total de sementes (N[°]TS) e o número

de sementes com embriões clorofilados (N°SEC). A porcentagem de germinação foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: % Germinação = [(N°SEC x 100)/ N°TS].

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2x4x5 (dois tempos de armazenamento, quatro meios nutritivos e cinco concentrações de ágar) com 3 repetições constituídas de um frasco de cultivo cada.

Os dados foram submetidos à análise de variância, com o auxílio do programa computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010), e as médias relativas aos tempos de cultivo foram comparadas pelo teste t de Student e às relativas aos meios nutritivos, pelo teste de Tukey, ambas até o nível de 5 % de probabilidade, enquanto que àquelas relativas às concentrações de ágar, foram ajustadas curvas de regressão.

O tempo de armazenamento das sementes, os meios nutritivos e a concentração de ágar atuaram isoladamente ($p < 0,01$) sobre a %G de sementes de *C. nobilior*. Houve interação significativa entre o tempo armazenamento e os meios nutritivos ($p < 0,01$), meios nutritivos e as concentrações de ágar ($p < 0,05$) e interação significativa entre os três fatores ($p < 0,05$) (Quadro 4).

QUADRO 4. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

F.V	G.L	Q.M
Armazenamento	1	22163,18**
Meio	3	283,84**
Ágar	4	211,57**
Arm. x Meio	3	899,39**
Arm. x Ágar	4	19,56 ^{ns}
Meio x Ágar	12	118,91*
Arm. x Meio X Ágar	12	99,90*
Erro	40	48,04
CV (%)	-	9,84
Média geral	-	70,42%

** = significativo a 1% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} = não significativo

De modo geral, as sementes de *C. nobilior* armazenadas por 90 dias, apresentaram os maiores valores de %G quando comparadas às sementes armazenadas por 210 dias e cultivadas nos mesmos meios de cultura (Quadro 5).

No entanto, em cada período de armazenamento, a germinação das sementes variou em função dos meios nutritivos e da concentração de ágar. Para as sementes armazenadas por 90 dias, os meios nutritivos diferiram estatisticamente entre si apenas

quando se utilizou a concentração de 8 g L⁻¹ de ágar. Nesse tratamento, os maiores valores de %G foram observados nos meios VW, KC e MS ½, sendo o menor valor observado no meio MS (Quadro 5).

QUADRO 5. Efeito conjunto do tempo de armazenamento das sementes (TA), do meio nutritivo e da concentração de ágar sobre a porcentagem de germinação de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

TA	Agar (g L ⁻¹)	Porcentagem de Germinação			
		KN	MS	MS ½	VW
90 dias	0	92,70Aa	82,01Aa	88,70Aa	83,33Aa
	2	86,25Aa	95,00Aa	93,86Aa	95,16Aa
	4	82,30Aa	78,86Aa	92,54Aa	78,36Aa
	6	83,51Aa	85,71Aa	89,47Aa	88,75Aa
	8	91,66Aa	67,10Ab	91,00Aa	95,04Aa
210 dias	0	65,38Ba	49,60Ba	50,35Ba	60,15Ba
	2	57,98Ba	67,40Ba	36,48Bb	72,75Ba
	4	50,94Bab	56,72Ba	32,70Bb	55,86Ba
	6	59,55Bab	71,50Ba	35,99Bc	52,06Bbc
	8	60,08Ba	57,30Ba	37,94Bb	44,74Bab

Letras maiúsculas comparam médias nos tempos de armazenamento na mesma concentração de ágar (*t* de Student a 5% de probabilidade).

Letras minúsculas comparam médias dos meios nutritivos na mesma concentração de ágar (Tukey a 5% de probabilidade).

KC (KNUDSON, 1946); VW (VACIN e WENT, 1949); MS e MS ½ (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Em relação às sementes armazenadas por 210 dias, houve maior variação da %G entre os meios nutritivos e as concentrações de ágar. Quando se utilizou meio líquido, os meios nutritivos não resultaram em valores de %G diferentes, entretanto, a partir da concentração de 2 g L⁻¹ de ágar, o meio MS ½ apresentou os menores valores de %G quando comparados aos demais meios nutritivos. O meio VW também resultou nos menores valores de %G quando se utilizou as concentrações de 6 e 8 g L⁻¹ de ágar (Quadro 5).

Para sementes armazenadas por 90 dias, observa-se que, no meio MS, o aumento da concentração de ágar resultou em aumento dos valores da %G até a concentração estimada de 2,35 g L⁻¹ obtendo-se valor máximo de 88,7%. A partir dessa concentração, os valores de %G decresceram. Para os demais meios nutritivos, as concentrações de ágar não diferiram entre si (Figura 3a).

Para sementes armazenadas por 210 dias (Figura 3b), pode-se observar que o meio MS ½, independentemente da concentração de ágar, resultou nos menores valores de %G e, no meio KC, a %G foi não variou em função da concentração de ágar. No meio VW a %G apresentou resposta linear decrescente, havendo diminuição da %G

com o aumento da concentração de ágar. Para o meio MS, a %G apresentou resposta quadrática e a maior %G foi observada quando a concentração de $4,7 \text{ g L}^{-1}$ de ágar foi utilizada, proporcionando valor máximo de 66,35%.

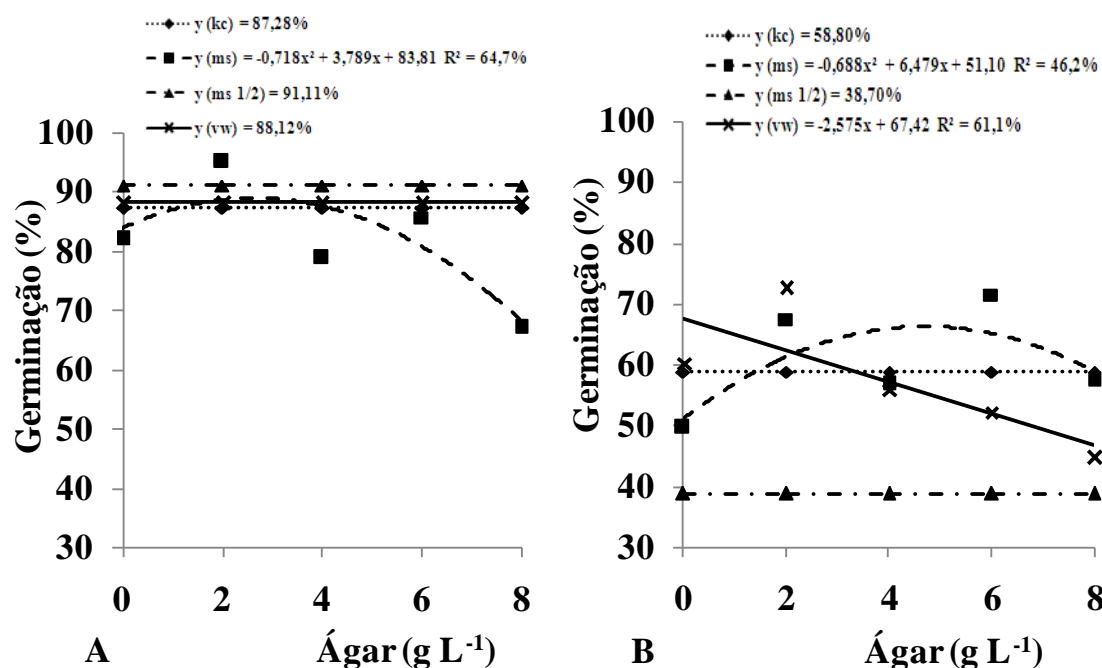


FIGURA 3. Efeito conjunto da concentração de ágar e do meio de cultura sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. armazenadas por a) 90 dias e b) 210 dias. KC = Knudson C, MS= Murashige e Skoog, MS ½= Murashige e Skoog com metade da concentração de nutrientes, VW = Vacin e Went. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Conforme KAUTH et al. (2008), as diferenças nas respostas germinativas das sementes são geralmente atribuídas à viabilidade e qualidade das mesmas, dessa forma, pode-se sugerir que a redução na germinação das sementes de *C. nobilior* ao longo do tempo de armazenamento, provavelmente esteja relacionada à redução da sua viabilidade, uma vez que os valores de %G observados após cada tempo de armazenamento estão próximos aos valores obtidos para a porcentagem de sementes viáveis de 90% para aquelas armazenadas por 90 dias e de 54% para aquelas armazenadas por 210 dias.

Como foi observado, o armazenamento das sementes de *C. nobilior* por 90 dias resultou em viabilidade e germinabilidade em torno de 90%. No entanto, aos 210 dias de armazenamento, a viabilidade e a germinabilidade de sementes de *C. nobilior* foram reduzidas pela metade (Quadro 5).

Sementes de *C. granulosa* Lindl., *C. hegeriana* (Campacci) Van den Berg, *C. intermedia* Graham ex Hook, *C. purpurata* (Lindl. e Paxton) Van den Berg, *C. sanguiloba* (Withner) Van den Berg, *C. tigrina* Verschaff. ex Lem e *C. walkeriana* Gardn armazenadas sob -18°C por 90 dias também apresentaram manutenção da sua viabilidade ao apresentarem %G acima de 96% (HOSOMI et al., 2012).

ALVAREZ-PARDO e FERREIRA (2006) obtiveram valores de viabilidade e germinação acima de 95% para sementes de *C. intermedia*, *C. intermedia* var. *pallida* Lindl. e *C. bicolor* armazenadas sob temperatura de 5°C . A redução da viabilidade e germinabilidade a 50% ocorreu apenas após 36 meses de armazenamento para *C. intermedia* var. *pallida* e 24 meses para *C. bicolor*.

Sementes de *Laelia albida* Bateman ex Lindl. apresentaram %G entre 85 a 75% quando armazenadas por um e dois anos, respectivamente, dentro de envelopes de papel sob 4°C (SANTOS-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Além do tempo de armazenamento, a composição química e a consistência dos meios de cultura também influenciaram a %G das sementes de *C. nobilior*, de maneira que sementes armazenadas por 210 dias apresentaram maior variação na %G quando comparadas às sementes armazenadas por 90 dias (Figura 3).

Os maiores valores de %G de sementes armazenadas por 210 dias, foram observados no meio VW líquido (ausência de ágar) e no meio MS e na concentração estimada de $4,7\text{ g L}^{-1}$ de ágar. O aumento da concentração de ágar nesses dois meios resultou em decréscimos dos valores de %G (Figura 3b). Conforme FARIA et al. (2012), o meio VW líquido provavelmente resultou em maior difusão dos nutrientes para as sementes, possibilitando os altos valores de %G observados. Com o aumento da concentração de ágar, entretanto, a %G decresceu devido à menor difusão de nutrientes às sementes.

Por outro lado, no meio MS, a %G das sementes armazenadas por 210 dias aumentou com o acréscimo da consistência do meio, até a concentração estimada de $4,7\text{ g L}^{-1}$ de ágar, sendo que, em concentrações superiores reduziram a germinação das sementes (Figura 3b), provavelmente devido à menor disponibilidade dos nutrientes em meios mais consistentes.

Os baixos valores de %G observados no meio MS $\frac{1}{2}$, em sementes armazenadas por 210 dias, podem ser devidas à menor concentração dos elementos magnésio, fósforo e enxofre desse meio, quando comparado aos demais meios nutritivos (Quadro 1).

Dessa forma, os meios nutritivos e a concentração de ágar influenciam a germinação de sementes armazenadas de *C. nobilior*. Sementes armazenadas por 90 dias apresentam maior viabilidade e germinabilidade quando comparadas às sementes armazenadas por 210 dias e o uso de sementes armazenadas por 210 dias pode resultar em %G acima de 65% quando semeadas em meio VW líquido ou MS + 4,7 g L⁻¹ de ágar.

EXPERIMENTO 3**Efeito de tratamento pré-germinativo na germinação de sementes de *Cattleya nobile***

Sob condições assépticas, 0,05 g de sementes *Cattleya nobile*, armazenadas por 90 dias e com viabilidade de 90%, foram embebidas, por 30, 60 ou 120 minutos, em soluções aquosas de ácido giberélico (GA₃) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4,0 mg L⁻¹.

Na sequência a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfetadas por 15 minutos com uma solução composta por 15 mL de hipoclorito de sódio comercial e 100 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Depois do descarte da água de lavagem as sementes receberam 100 mL de água destilada estéril e, 200 µL dessa suspensão de sementes, foram inoculados em cada frasco de cultivo.

Como frascos de cultivos foram utilizados recipientes de plástico transparente, providos de tampa rosqueável, com capacidade para 50 mL que receberam 10 mL do meio de cultura MS ½, geleificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,8 ±0,1 com KOH (0,1M). A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a solidificação, os recipientes contendo o meio de cultura foram transferidos para ambiente asséptico para a realização da semeadura *in vitro*.

Logo depois da semeadura, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 µmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Aos 30 dias de cultivo foi avaliada a germinação. Para tanto, foram adicionados em cada frasco, 10 mL de água destilada, e após a agitação manual a suspensão de sementes foi vertida em placas Petri e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, contou-se o número total de sementes (N°TS) e o número de sementes com embriões clorofilados (N°SC). A porcentagem de germinação foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: Germinação (%) = [(N°SC x 100)/ N°TS].

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema de parcelas subdivididas, sendo alocadas nas parcelas as concentrações de GA₃ e, nas subparcelas, os três tempos de embebição, com

três repetições de um frasco de cultivo cada. Os dados foram submetidos à análise de variância com a utilização do aplicativo SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010) e aos fatores significativos foram ajustadas curvas de regressão.

Houve efeito significativo da interação entre concentração de ácido giberélico (GA₃) e tempo de imersão ($p < 0,05$) sobre a %G de sementes de *C. nobilior*, não sendo registrados efeitos isolados ($p > 0,05$) dos fatores estudados (Quadro 6).

QUADRO 6 . Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em função da concentração e do tempo de imersão das sementes em ácido giberélico . UFGD, Dourados – MS, 2013.

F.V	G.L	Q.M
GA₃	4	20,63 ^{ns}
Erro A	10	14,91
Tempo de imersão	2	6,86 ^{ns}
GA₃ x Tempo de imersão	8	63,17*
Erro B	20	20,63
CV (%)	4,51%	
Média geral	85,61%	

* = significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} = não significativo

A imersão das sementes de *C. nobilior* nas diferentes soluções de GA₃ não resultou em acréscimos na %G, uma vez que os valores observados foram estatisticamente semelhantes aos observados para as sementes imersas em água. Além disso, com o aumento do tempo de imersão de 30 para 120 minutos, o uso de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ reduziu a %G de 87,98 para 75,11%, respectivamente (Figura 4).

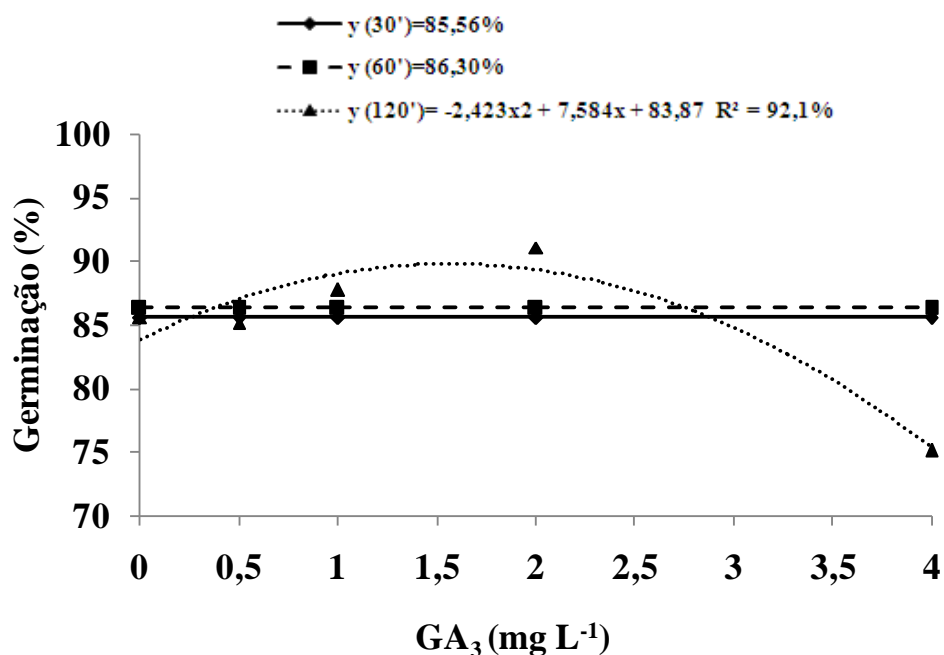


FIGURA 4. Efeito conjunto da concentração de giberelina e do tempo de imersão das sementes sobre a porcentagem de germinação (%G) de sementes de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

O GA₃ aumenta a concentração de carboidratos solúveis durante a germinação da semente e o crescimento da planta (BIALECKA e KEPCZNSKI, 2007) e promove o alongamento celular (TAIZ e ZEIGER, 2008). Alguns trabalhos têm comprovado que o emprego de ácido giberélico como tratamento pré-germinativo em sementes de diversas espécies arbóreas estimula a germinação (SCALON et al., 2005).

No entanto, como no presente trabalho houve germinação em todas as concentrações de GA₃, sugere-se, conforme LEITE e HEBLING (2007), que o conteúdo de giberelina endógena das sementes de *C. nobilior* tenha sido suficiente para estimular a germinação.

Diferentes respostas germinativas foram observadas para outras espécies de orquídeas quando giberelinas foram adicionadas ao meio ou foram utilizadas como tratamentos pré-germinativos.

Enquanto que para *Comparettia falcata* Poeppig e Endlicher, a adição de giberelina ao meio de cultura favoreceu a germinação das sementes (PEDROZA-MANRIQUE et al., 2005), para sementes de *C. warnerri*, o GA₃ promoveu a germinação apenas na ausência de luz (LEITE e HEBLING, 2007) e para sementes de *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz, a adição de adição de 1,0 mg L⁻¹ de GA₄₊₇ ao meio de

cultura não promoveu a germinação, resultando em valores de %G similares estatisticamente ao controle (PIERIK et al., 1988).

Do mesmo modo, o emprego de giberelina como tratamento pré-germinativo, também resultou em variação nas respostas germinativas de algumas espécies de orquídeas.

A imersão de sementes de *C. bicolor* por 24 h em solução de 1,0 mg L⁻¹ de GA₃ resultou em maior número de plantas, como resultado de maior germinação das sementes (SANTOS et al., 2007). Por outro lado, MIYOSHI e MII (1995) não observaram efeito significativo na germinação de sementes de *Calanthe discolor* Lindl. imersas em soluções de 10 ou 100 mg L⁻¹ de GA₃ por 24 horas. MACEDO et al. (2011) também não observaram efeito significativo da imersão de sementes de *Brassavola cebolleta* Rchb. f. em soluções de 0,5; 1,0; 2,0 e 4 mg L⁻¹ de GA₃, por 30, 60 e 120 minutos sobre a germinação de sementes e os resultados foram semelhantes aos observados para o controle.

No entanto, houve redução da %G de *C. nobilior* quando as sementes foram imersas em solução de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃ por 120 minutos (Figura 4). Para *Dendrobium nobile* Lindl. também houve redução na %G quando as sementes foram imersas por 24 horas em soluções de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹ de GA₃ (SOARES et al., 2012b).

Dessa forma, a imersão das sementes de *C. nobilior* em água por 30 minutos é suficiente em estimular a germinação. O emprego de soluções de GA₃ como tratamento pré-germinativo não resultou em aumento significativo na %G dessa espécie, nas concentrações e nos tempos de imersão empregados.

EXPERIMENTO 4

Efeito do meio nutritivo e da concentração de ágar no desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobile*

Sob condições assépticas, 0,10 g de sementes de *Cattleya nobile*, armazenadas por 210 e com viabilidade de 54%, foram embebidas em água destilada estéril por 15 minutos. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfetadas por 15 minutos com uma solução composta por 15 mL de hipoclorito de sódio comercial e 100 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Em seguida ao descarte da água de lavagem as sementes receberam 400 mL de água destilada estéril e, 2000 µL dessa suspensão de sementes, foram inoculados em cada frasco de cultivo.

Como frascos de cultivos foram utilizados recipientes de vidro transparente, providos de tampa metálica, com capacidade para 600 mL que receberam 80 mL de um dos meios de cultura estudados. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Logo depois da solidificação, os recipientes contendo os meios de cultura foram transferidos para ambiente asséptico para a realização da semeadura *in vitro*.

Foram estudados os meios de cultivo KC (KNUDSON, 1946), VW (VACIN e WENT, 1949), MS e MS ½ (MURASHIGE e SKOOG, 1962), geleificados com 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 ou 8,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Os meios KC e VW foram acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose e os meios MS e MS ½ foram acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, tendo o pH ajustado para 5,8±0,1 com KOH (0,1M).

Após a semeadura, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 µmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Aos 90 dias de cultivo foram feitas avaliações dos estágios de desenvolvimento dos protocormos. Para tanto, foram adicionados em cada frasco, 10 mL de água destilada, e após a agitação manual o material foi vertido em placa de Petri e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico foi classificado em: Estágio 1 = protocormo intumescido e verde; Estágio 2 = protocormo com uma folha ou duas folhas pouco

desenvolvidas; Estágio 3 = protocormos com folhas bem desenvolvidas e Estágio 4 = protocormo com folhas bem desenvolvidas e raízes (Figura 5), com base na classificação de STEWART e KANE (2006):

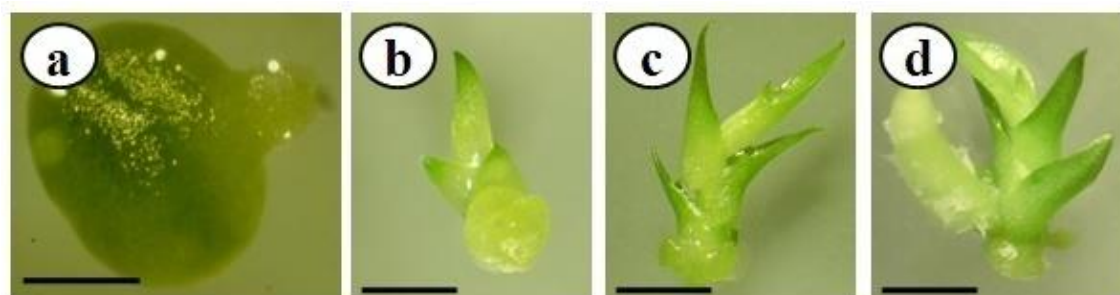


FIGURA 5. Estágios de desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobilior*. a) estágio 1 barra = 1,5 mm. b) estágio 2 barra = 3,0 mm. c) estágio 3 barra = 3,0 mm. d) estágio 4 barra = 3,0 mm. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Em cada amostra avaliada, foram contados o número total de protocormos ($N^{\circ}TP$) e o número de protocormos em cada estágio de desenvolvimento (P_x) para a determinação das porcentagens de protocormos ($\% P_x$) em estágio 1, 2, 3 e 4, de acordo com a seguinte fórmula: $\% P_x = (P_x \times 100) / N^{\circ}TP$.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 4x5 (quatro meios nutritivos e cinco concentrações de ágar) com 3 repetições constituídas de um frasco de cultivo. Os dados foram submetidos à análise de variância, com a utilização do aplicativo SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010), sendo o fator qualitativo comparados por teste de Tukey, até o nível de 5% de probabilidade, e ao quantitativo foram ajustadas equações de regressão.

Os meios nutritivos e as concentrações de ágar atuaram significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) sobre a porcentagem de protocormos em estágio 1 ($\%P1$), 3 ($\%P3$), 4 ($\%P4$) e sobre o número total de protocormos (PT). Houve também interação significativa desses fatores sobre todas as características estudadas (Quadro 7).

QUADRO 7. Resumo da análise de variância do desenvolvimento de protocormos de *Cattleya nobilior* Rchb.f. avaliados aos 90 dias após a semeadura. UFGD, Dourados – MS, 2013.

F.V.	G.L.	Quadrados médios				
		%P1	%P2	%P3	%P4	PT
Meio	3	61,76**	4,86 ^{ns}	84,17**	3,17**	326,96**
Agar	4	26,09**	4,85 ^{ns}	40,75**	0,72*	23,23**
Meio x Ágar	12	9,17**	5,14*	9,31**	0,53*	18,32**
Erro	40	1,46	2,28	1,11	0,22	3,01

CV(%)	-	18,10	36,71	23,68	37,26	11,58
M. geral (%)	-	51,47%	19,08%	28,34%	1,11%	-
N° Prot_{corn}	-	109,55	49,32	99,01	3,79	261,67

De modo geral, os meios líquidos (0 g L⁻¹ de ágar) resultaram em elevada %P1 (acima de 70%), independentemente do meio nutritivo utilizado (Figura 6a). Por outro lado, baixos valores de %P2, %P3 e %P4 foram observados nestes meios. Esse resultado sugere que os meios líquidos possibilitam a germinação e o desenvolvimento de protocormos de *C. nobilior* até ao estágio de desenvolvimento 1, entretanto, impossibilita a formação de protocormos completos, ou seja, com folhas bem desenvolvidas e raízes.

Com exceção do meio VW, a concentração de ágar influenciou o desenvolvimento de protocormos de *C. nobilior* nos diferentes meios nutritivos. Os valores médios de %P1, %P2 e %P3 observados no meio VW foram de 80,21%, 13,46% e 6,30%, respectivamente (Figura 6).

O meio KC apresentou elevada formação de P1, sendo o valor máximo de (85,36%) observado na concentração estimada de 3,0 g L⁻¹ de ágar (Figura 6a). Foram observados também valores médios de P2 (Figura 6b) e de P3 (Figura 6c) de 46% e 34,54%, respectivamente, quando se utilizou a concentração de 8 g L⁻¹ de ágar. A formação de P4 não foi observada neste meio.

Nos meios MS e MS ½, os maiores valores de %P1 foram observados apenas na ausência de ágar, embora o uso de 8 g L⁻¹ de ágar no meio MS ½ tenha resultado em valores de %P1 em torno de 38,55% (Figura 6a). Baixos valores de %P2 também foram observados nestes meios, sendo em média de 16,9% no meio MS ½ e 13,5% no meio MS (Figura 6b). Em contrapartida, elevados valores de %P3 foram observados nestes meios de maneira que a %P3 foi em média 79,90% no meio MS ½ quando se fez uso de 4,75 g L⁻¹ de ágar e 67,32% no meio MS na concentração de 5,51 g L⁻¹ de ágar (Figura 6c).

A presença de protocormos em estágio 4 foi observada apenas nos meios MS e MS ½. No meio MS, independentemente da concentração de ágar, 0,37% das sementes semeadas se converteram em plantas inteiras, após os 90 dias de cultivo *in vitro*. Por outro lado, o aumento da concentração de ágar resultou em aumento do %P4 no meio MS ½, sendo possível obter um valor máximo de 7,06% de P4 em uma amostra de sementes, na concentração de 4,66 g L⁻¹ de ágar (Figura 6d).

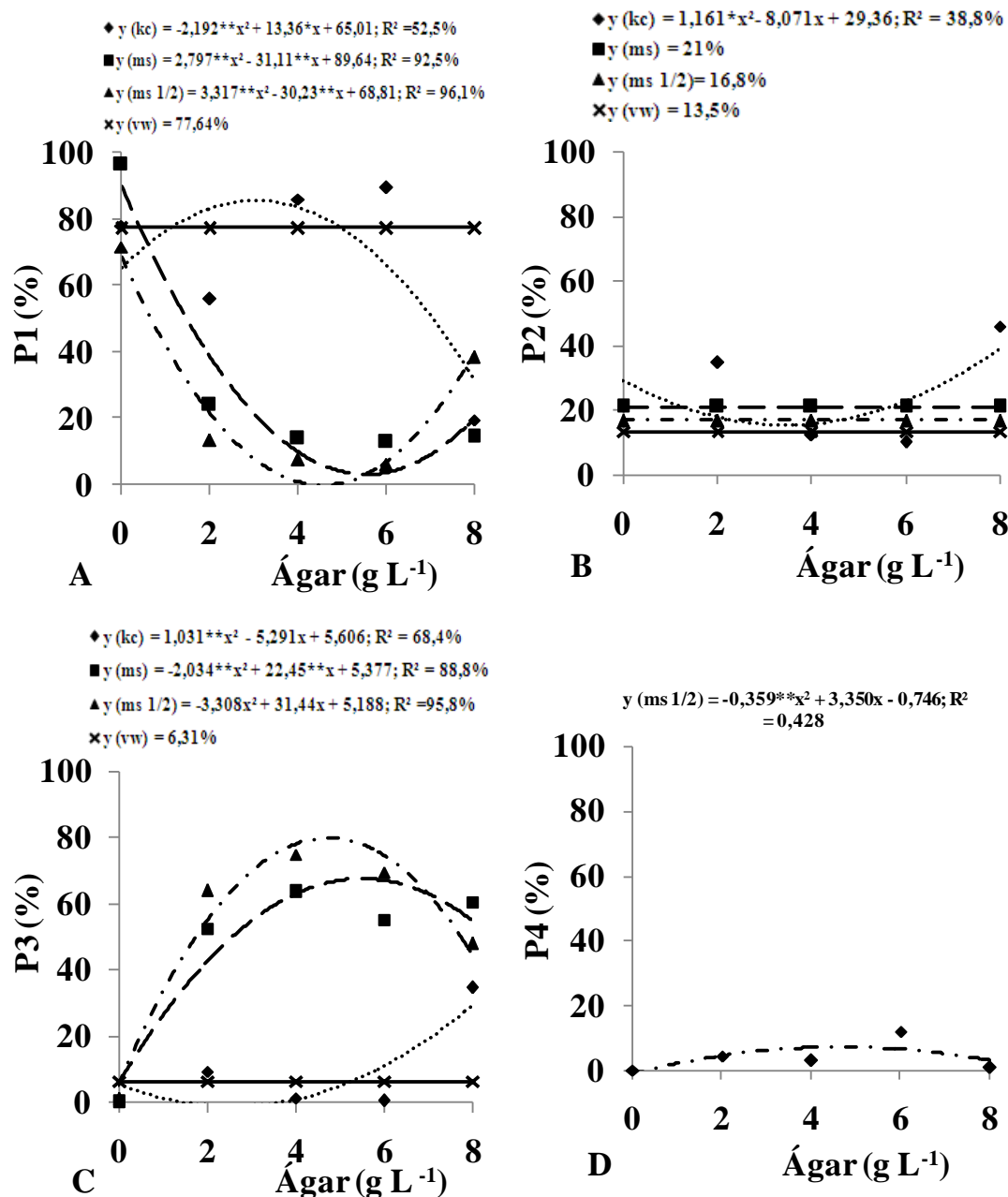


FIGURA 6. Efeito do meio nutritivo e da concentração de ágar sobre a porcentagem de protocormos em estágio 01 (%P1) (a), em estágio 02 (%) (b) e em estágio 03 (%P3) (c) e da concentração de ágar sobre a porcentagem de protocormos em estágio 04 (%P4) obtida em meio MS ½ (d) de *Cattleya nobile* Rchb. f. Dourados- MS, UFGD, 2013.

As diferenças observadas no desenvolvimento dos protocormos de *C. nobile* podem ser devidas à variação na composição dos meios de cultura utilizados. De acordo com o Quadro 1, pode-se observar que o meio MS apresenta a maior diversidade e concentração de macro e micronutrientes, vitaminas e aminoácidos. O meio MS ½ é composto pelos mesmos constituintes do meio MS, entretanto, com

metade da concentração. Já os meios KC e VW apresentam menor concentração de macronutrientes, menor diversidade de micronutrientes e não são constituídos de vitaminas e aminoácidos.

Dessa forma, sugere-se que os maiores valores de %P3 (Figura 6a) observados nos meios MS e MS ½ sejam devidos ao maior fornecimento de nutrientes minerais e substâncias orgânicas presentes nestes meios, os quais sustentaram o rápido crescimento dos protocormos e possibilitaram a formação de folhas, quando comparados aos demais meios nutritivos.

No entanto, como os maiores valores de %P4 foram observados no meio MS ½ (Figura 6b), sugere-se que a concentração de nutrientes deste meio seja mais adequada, além de econômica, para o desenvolvimento de protocormos de *C. nobilior*.

Dessa maneira, como os meios MS e MS ½ apresentaram elevados valores de %P3 e também apresentaram formação de protocormos em estágio 04, sugere-se que para o desenvolvimento de protocormos de *C. nobilior* seja necessário um elevado suprimento de nutrientes minerais, além de micronutrientes e vitaminas.

Os meios MS e MS ½ também foram efetivos no desenvolvimento de plantas de *Dendrobium tosaense* Makino originadas de cápsulas em diferentes estágios de maturação, enquanto que os meios KC e VW foram menos efetivos (LO et al., 2004). O uso de meio MS possibilitou a formação completa de protocormos de *C. violacea* (Kunth) Rolfe aos 60 dias após a semeadura (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013).

No presente trabalho, os meios KC e VW apresentaram elevados valores de %P1 quando comparados aos meios MS e MS ½ (Figura 6a), entretanto, o desenvolvimento dos protocormos nos demais estágios foi menos pronunciado, provavelmente devido à ausência de micronutrientes e vitaminas.

Para *C. warnerii*, os meios KC e VW foram os que proporcionaram o maior desenvolvimento dos protocormos os quais atingiram o estágio 3 de desenvolvimento após 90 dias de cultivo *in vitro*. Quando os protocormos foram cultivados em meio MS e MS ½, o seu desenvolvimento não ultrapassou a fase 1 (JORGE et al., 2011). SUZUKI et al (2010) também observaram maior desenvolvimento dos protocormos de *C. bicolor* (estágio 2) em meio KC. MATA-ROSAS e SALAZAR-ROJAS (2009) observaram maior formação e desenvolvimento de protocormos de *Mormodes tuxtlensis* Salazar em meio KC modificado, quando comparado ao meio MS.

Como foi observado, os meios líquidos favoreceram a formação de protocormos em estágio 1 em todos os meios nutritivos, entretanto, apenas uma pequena

parcela desses protocolos se desenvolveu nos estágios subsequentes. Dessa forma, o meio líquido pode ser uma alternativa para a avaliação da %G de sementes de *C. nobilior*, entretanto não deve ser utilizado para trabalhos direcionados à produção de mudas.

3 - CONCLUSÕES

A porcentagem de germinação de sementes de *Cattleya nobile* é dependente do tempo de armazenamento e da concentração de ágar e do meio nutritivo.

O uso de GA₃ como tratamento pré-germinativo não influenciou a germinação de sementes de *Cattleya nobile*.

Sementes de *Cattleya nobile* podem ser semeadas em meios nutritivos isentos de agentes geleificantes para a obtenção de porcentagem de germinação superior a 80%.

Todos os meios de cultura avaliados (MS, MS ½, VW e KN) foram eficientes em promover a germinação e a formação de protocormos até o estágio 3, independentemente da concentração de ágar (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹).

Entre os meios nutritivos avaliados (MS, MS ½, VW e KN), os meios MS e MS ½ foram os que proporcionaram as maiores porcentagens de germinação, e possibilitaram o desenvolvimento de protocormos até o estágio 04, em 90 dias de cultivo *in vitro*.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.28, n.2, p.92-98, 2006.

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.61-67, 2006.

BARROS, F. D; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20010> > Acesso em: 29 out. 2013.

BHADRA, S. K.; HOSSAIN, M. M. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. **Plant tissue culture**, v.13, n.2, p.167-171, 2003. Disponível em: < <http://www.baptcb.org/ptc/abstracts.asp?YEAR=247> > Acesso em: 25 jan. 2013.

BIALECKA, B.; KEPCZNSKI, J. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthus caudatus* L. seeds in relation to ethylene, gibberellins GA₃ and methyl jasmonate. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.51, n.1, p.21-31, 2007.

BIANCHETTI, L. B. *Cattleya nobilior* Rchb.f. **Heringeriana**, Brasília, v.1, n.1, p.9-10, 2007.

BOLDRINI, R. F.; SANTOS, W.O.; CRUZ, Z.M.A.; RAMOS, A.C. Bases da associação micorrízica orquidóide. **Natureza on line**, v.8, n.3, p.140-145, 2010. Disponível em: < http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/08_BoldriniRFetal_140145.pdf > Acesso em : 25 jan. 2013.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 69 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

DAMON, A.; AGUILAR-GUERRERO, E.; RIVERA, L.; NIKOLAEVA, V. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de três espécies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. **Revista Chapingo: Série Horticultura**, v.10, n.2, p.195-203, 2004. Disponível em: < http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?anio=2004&vol=X&num=2&id_rev=1 > Acesso em: 12 jan. 2013.

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**, Maringá, v.28, n.1, p.71-74, 2006.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012. 124p.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** – Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras – MG: UFLA, 2010.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO, A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, Manaus, v.43, n.2, p.127-134, 2013.

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672013000200001&script=sci_abstract&tlng=pt >. Acesso: 25 jan. 2013.

HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.13, p.231-239, 1993.

HOSOMI, S. T.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.48, p.127-136, 2012. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11627-011-9404-1> >. Acesso: 26 jan. 2013.

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E.; PÉREZ, H. E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.63, p.89-99, 2011.

JORGE, J.; ABRÃO, M. C. R.; SUZUJI, R. M. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae) *in vitro*. In: 18ª REUNIÃO ANNUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 4., 2011, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto de Botânica, 2011. Disponível em : < <http://www.ibot.sp.gov.br/publicacoes/raibt/2012/21.pdf> >. Acesso: 13 jan. 2013.

KAUTH, P. J.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. A.; REINHARDT – ADAMS, C. Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. **Annals of Botany**, v.102, p.783-793, 2008. Disponível em : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712386/> >. Acesso: 13 jan. 2013.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

LAVRENTYEVA, A.M.; IVANNIKOV, R.V.; *In vitro* propagation of *Cattleya* Lindl. and *Laelia* Lindl. species. **Lankesteriana**, v.7, n.1-2, p.147-149, 2007. Disponível em : < [http://lankesteriana.org/lankesteriana/Lankesteriana%20vol.%207.%202007/Lankesteriana%207\(1-2\)/033%20Lavrentyeva%20&%20Ivannikov.pdf](http://lankesteriana.org/lankesteriana/Lankesteriana%20vol.%207.%202007/Lankesteriana%207(1-2)/033%20Lavrentyeva%20&%20Ivannikov.pdf) > Acesso: 13 jan. 2013.

LEITE, V. C. A.; HEBLING, S. A. Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. **Natureza on line**, v.5, n.2, p.55-62, 2007. Disponível em : < http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_LeiteVCA_HeblingSA_5562.pdf > Acesso: 26 jan. 2013.

LO, S.; NALAWADE, S. M.; KUO, C.; CHEN, C.; TSAY, H. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.40, p.528-535, 2004. Disponível em : < <http://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2004571>>. Acesso: 3 fev. 2013.

MACEDO, M. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; HOFFMANN, N. T. K.; SILVA, N. V.; ROSA, R. J. M. Efeito do ácido giberélico e do tempo de embebição na germinação assimiótica de *Brassavola cebolleta* Rchb. f. In: I ENCONTRO SOBRE ORQUÍDEAS NATIVAS E ADAPTADAS AO CERRA BRASILEIRO, 2011, Chapadão do Sul. **Resumos...**Chapadão do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

MATA-ROSAS, M.; SALAZAR-ROJAS, V. M. Propagation and establishment of three endangered mexican orchids from protocorms. **HortScience**, Alexandria, v.44, n.5, p.1395-1399, 2009.

McKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; TAYLOR, D. L.; READ, D. J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Lancaster, v.145, p.523-537, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. Instrução normativa n. 6 de 23 de setembro de 2008. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>. > Acesso: 14 jan. 2013

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

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

PAUL, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v.2012, p.1-12, 2012. Disponível em: < <http://aobpla.oxfordjournals.org/content/2012/plr032.full> >. Acesso: 2 fev. 2013.

PEDROZA-MANRIQUE, J.; MICAN-GUTIÉRREZ, Y. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.f. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.42, p.543-547, 2006. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2006793> >. Acesso: Acesso: 2 fev. 2013.

PEDROZA-MANRIQUE, J.; FERNANDEZ-LIZARAZO, C.; SUAREZ-SILVA, A. Evaluation fo the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under *in vitro* conditions. ***In vitro Cellular and Developmental Biology***, v.41, p.838-843, 2005. Disponível em: <

<http://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2005698> >. Acesso: Acesso: 2 jan. 2013.

PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P. A.; VAN DER HARST, B.; VAN DER MEYS, Q. G. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. ***Scientia Horticulturae***, Amsterdam, v.34, p.139-153, 1988.

PIRIA, R. S.; RAJMOHAN, K.; SURESH, S. *In vitro* production of protocorms and protocorm like bodies in orchids – a review. ***Agricultural Reviews***, v.29, n.1, p.40-47, 2008. Disponível em: <

<http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ar&volume=29&issue=1&article=005> > Acesso: Acesso: 2 jan. 2013.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320p.

RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. ***Plant and Soil***, Dordrecht, v.244, p.149-163, 2002.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, F. N. Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. ***Lankesteriana***, v.7, n.1-2, p.334-341, 2007. Disponível em: <

[http://lankesteriana.org/lankesteriana/Lankesteriana%20vol.%207.%202007/Lankesteriana%207\(1-2\)/079%20Rasmussen%20&%20Rasmussen.pdf](http://lankesteriana.org/lankesteriana/Lankesteriana%20vol.%207.%202007/Lankesteriana%207(1-2)/079%20Rasmussen%20&%20Rasmussen.pdf) > Acesso: 26 fev. 2013.

SAHA, D.; RAO, A. N. Studies on endophytic mycorrhiza of some selected orchids of Arunachal Pradesh – 1. Isolation and Identification. ***Bulletin of Arunachal Forest Research***, Arunachal Pradesh, v.22, n.1-2, p.9-16, 2006.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. ***Cesumar***, Maringá, v.9, n.1, p.7-12, 2007.

SANTOS-HERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.; CAMPOS, J.E.; AGUIRRE-LEÓN, E. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. ***HortScience***, Alexandria – EUA, v.40, n.2, p.439-442, 2005.

SCALON, S. P. Q.; RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C. Germinação de sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss: armazenamento, embalagens e tratamentos pré-germinativos. ***Revista Brasileira de Plantas Mediciniais***, Botucatu, v.7, n.2, p.32-36, 2005.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Life in the freezer: Orchid Seed Banking for the Future. ***Orchid***, p.762-773, 2008. Disponível em: < <http://www.aos.org> >. Acesso: 26 jan. 2013.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana**, v.11, n.3, p.349-353, 2011. Disponível em: <
[http://lankesteriana.org/lankesteriana/LANKESTERIANA%2011\(3\)%2021_Lankesteriana%2011\(3\)%20Seaton&Pritchard.pdf](http://lankesteriana.org/lankesteriana/LANKESTERIANA%2011(3)%2021_Lankesteriana%2011(3)%20Seaton&Pritchard.pdf) > Acesso: 26 jan. 2013.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p. 25-33, 2001.

STEWART, S.L.; KANE, M.E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006. Disponível em: <
<http://hort.ufl.edu/plant-restoration/kane-lab/orchids/pdf/articles/18-stewart-2006-asymbiotic-germination-habenaria-macroceratitis.pdf> > Acesso: Acesso: 13 fev. 2013.

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 alternativa suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v.24, n.3, p.226-233, 2012. a

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

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v.37, n.4, p.731-742, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819p.

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.223-228, 2006. Disponível em:< <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7757> > Acesso: Acesso: 13 abr. 2013.

TSAI, W.; CHU, C. Static liquid culture of *Doritaenopsis* seedlings. **HortScience**, v.43, n.1, p.206-210, 2008. Disponível em: <
<http://hortsci.ashspublications.org/content/43/1/206.full.pdf> > Acesso: 3 jan. 2013.

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

YODER, J. A.; ZETTLER, L. W.; STEWART, S. L. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. **Plant Science**, v.156, p.145-150, 2000.

CAPÍTULO 2

**CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE *Cattleya nobile* RCHB.F.
(ORCHIDACEAE)****RESUMO**

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar o efeito da água de coco e de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de plantas de *Cattleya nobile* Rchb.f.. Para tanto foram desenvolvidos dois experimentos independentes. No primeiro experimento, os explantes de *C. nobile* foram cultivados por 90 e 180 dias em meio de cultura MS geleificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose e de diferentes concentrações de água de coco (0; 5; 10; 20 e 25%). No segundo experimento, os explantes de *C. nobile* foram cultivados por 120 dias em meio MS ½, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e enriquecido com BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). Em ambos os experimentos, o pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da esterilização em autoclave a 120 °C e 1,0 atm durante 20 minutos e após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 μmol m⁻² s⁻¹. No primeiro experimento, verificou-se que, a adição de 25% de água de coco resultou nos maiores valores de massa fresca e seca e no maior comprimento da parte aérea das plantas. O maior número de raízes foi obtido aos 90 dias de cultivo na ausência de água de coco. Os maiores valores de número de brotos e de comprimento de raízes foram observados aos 180 dias enquanto que para o número de folhas, não foi observado efeito significativo dos tratamentos. Em relação ao segundo experimento, os maiores valores de porcentagem de sobrevivência, número de brotos e raízes, comprimento da parte aérea e massa fresca foram obtidos na ausência de reguladores de crescimento. A porcentagem de massa fresca da parte aérea foi maior com a adição de 4,0 mg L⁻¹ de BAP enquanto que o maior número de folhas foi observado com a adição de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e o comprimento da maior raiz foi maior na presença de 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

Palavras – chave: Orquídea, cultivo *in vitro*, água de coco, reguladores de crescimento.

ABSTRACT

This work was conducted with the objective of evaluating the effect of coconut water and growth regulators on *in vitro* culture of plants of *Cattleya nobilior* Rchb.f.. For this purpose, two experiments were conducted. In the first experiment, *C. nobilior* explants were cultured for 90 and 180 days on MS medium gelled with agar 5.5 g L⁻¹, plus sucrose 20 g L⁻¹ and different concentrations of coconut water (0; 5; 10; 20 e 25%). In the second experiment, *C. nobilior* explants were grown for 120 days on ½ MS medium, gelled with agar 5.5 g L⁻¹, plus sucrose 20 g L⁻¹ and supplemented with BAP (0.0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and NAA (0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹). In both experiments, the pH was adjusted to 5.8 ± 0,1 before autoclaving at 120 °C and 1.0 atm for 20 minutes and after inoculation, the cultures were maintained in a growth room at 25 ± 2 °C, photoperiod of 12 hours and photosynthetically active radiation of 20 μmol m⁻² s⁻¹. In the first experiment, it was found that the addition of 25% coconut water resulted in higher values of fresh and dry mass and greatest length of shoots. On the other hand, the highest number of roots was obtained after 90 days of culture in the absence of coconut water. The highest values of shoot number and root length were observed at 180 days while for the number of leaves, there was no significant effect of the treatments. Regarding the second experiment, the highest values of survival percentage, shoot and root number, shoot length and fresh weight were obtained in the absence of growth regulator. The percentage of fresh weight of shoots was higher with the addition of BAP 4.0 mg L⁻¹, while the highest number of leaves was observed with the addition of NAA 0.5 mg L⁻¹ and the greater root length was higher in the presence of NAA 2.0 mg L⁻¹.

Key words: Orchid, *in vitro* culture, coconut water, growth regulators.

EXPERIMENTO 1

Efeito da água de coco no cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior*

1 - INTRODUÇÃO

A extração de orquídeas nativas da flora sul mato-grossense constitui um dos principais fatores para a diminuição das populações locais. Segundo MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2008), entre as espécies alvo destaca-se *Cattleya nobilior* Rchb.f. que embora não seja considerada ameaçada de extinção, encontra-se na lista de espécies cujas informações são ainda deficientes para enquadramento na condição de ameaçada.

A *C. nobilior* é uma orquídea epífita ou rupícola de crescimento simpodial que ocorre também nos estados de Goiás, Mato Grosso, Pará, Tocantins, Maranhão e Distrito Federal e em países como Paraguai e Bolívia (BARROS et al., 2013; BIANCHETTI, 2007). O seu florescimento ocorre nos meses de agosto a setembro e as plantas produzem inflorescências compostas por duas ou três flores grandes predominantemente róseo-lilases, muito vistosas e de grande valor comercial (POTT e POTT, 1994; BIANCHETTI, 2007; RODRIGUEZ et al., 2009; BARROS et al., 2013).

A busca por alternativas que visam integrar atividades focadas tanto na conservação de espécies de orquídeas dentro de áreas nativas, quanto na produção comercial de mudas constitui um dos principais desafios para prevenir a diminuição de populações naturais (ROBERTS et al., 2007). Nesse sentido, a propagação *in vitro* é um método valioso uma vez que possibilita a produção de grande número de propágulos dentro de um período de tempo relativamente curto (PUCHOOA, 2004; BASKER e BAI, 2006).

Contudo, algumas orquídeas apresentam um desenvolvimento lento sob condições *in vitro*, semelhante ao que acontece na natureza sendo necessária a adição de substâncias que promovam a multiplicação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas (COSTA et al., 2009). Neste contexto, a suplementação do meio de cultura com aditivos orgânicos como a água de coco (endosperma líquido de *Cocus nucifera* L.) tem proporcionado efeitos benéficos no crescimento *in vitro* de diversas espécies de orquídeas, além de ser um procedimento simples e acessível aos produtores

(ICHIHASHI e ISLAN, 1999; VENTURA, 2007; VIEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012).

A água de coco é composta por uma mistura complexa de elementos orgânicos e inorgânicos e apresenta importante ação tamponante. Apresenta em sua composição magnésio, fósforo, nitrogênio, ferro, enxofre, potássio, sódio, e cobre, sendo também composta por ácidos orgânicos, aminoácidos, enzimas, fitormônios (como as citocininas), vitaminas e açúcares (KRIKORIAN, 1991; CALDAS et al., 1998; RITCHER et al., 2005; GNASEKARAN et al., 2012).

Os efeitos benéficos da água de coco no cultivo *in vitro* tem sido relatados na neoformação de protocormos de *Dendrobium Swartz* ‘Sonia’ (PUCHOOA, 2004), de *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. (KAUR e BHUTANI, 2012) e de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. (SINHA e ROY, 2004), no aumento no número de brotações de *Paraphalaenopsis serpentiligua* J.J.Sm. (MUKARLINA et al., 2010) e de *Paphiopedilum* sp. (HUANG et al., 2001) e no aumento do crescimento de híbridos de *Calanthe* (BAQUE et al., 2011) e de *Cattleya* (ARAÚJO et al., 2006).

Não há relatos na literatura sobre o efeito da utilização de água de coco no cultivo *in vitro* de plantas de *C. nobilior*. Nesse sentido, objetivou-se com este estudo avaliar o crescimento *in vitro* de plantas de *C. nobilior* em função do tempo de cultivo e da suplementação do meio de cultura com água de coco.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido 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 novembro de 2010 a maio de 2011.

Foram utilizados como explantes brotos de *Cattleya nobilior* (Figura 1a), com oito meses, oriundos de sementeira *in vitro*, mantidos sala de crescimento ($25 \pm 2^\circ$ C, fotoperíodo de 12 h e radiação fotossintética ativa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 20 g L^{-1} de sacarose, geleificado com $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e sem subcultivos.

Sob condições assépticas, cinco explantes com aproximadamente 8 mm de comprimento, com três folhas e desprovidos de raízes, foram destacados das plantas de origem e inoculados em frascos de vidro (Figura 1b) contendo 60 mL de meio de cultura MS, acrescido de 20 g L^{-1} de sacarose, geleificado com $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico e suplementado com 0; 5; 10; 20 ou 25% de água de coco verde.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com KOH (1M) antes da esterilização em autoclave a 120° C e 1,0 atm durante 20 minutos. Foram utilizados frascos com capacidade para 600 mL providos de tampas metálicas. A água de coco utilizada foi oriunda de frutos verdes e peneirada antes do seu uso.

Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W cada.

Após 90 dias de cultivo duas plantas de cada frasco foram retiradas dos mesmos e, a seguir, foram lavadas em água corrente e avaliadas quanto ao número de brotos por planta. A seguir, os brotos de cada planta foram separados e avaliados quanto ao número de folhas e raízes, comprimento da parte aérea e das raízes, massa fresca e seca e porcentagens de massa fresca e seca da parte aérea e das raízes.

As outras três plantas restantes (Figura 1c) foram transferidas para meios de cultura com a mesma formulação anterior. Foram utilizados frascos contendo o mesmo volume de meio de cultura, e as condições de preparo dos meios foram semelhantes às descritas anteriormente. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e luminosidade por mais 90 dias. Após esse período, as três

plantas restantes (Figura 1d) foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e avaliadas quanto às mesmas características vegetativas.

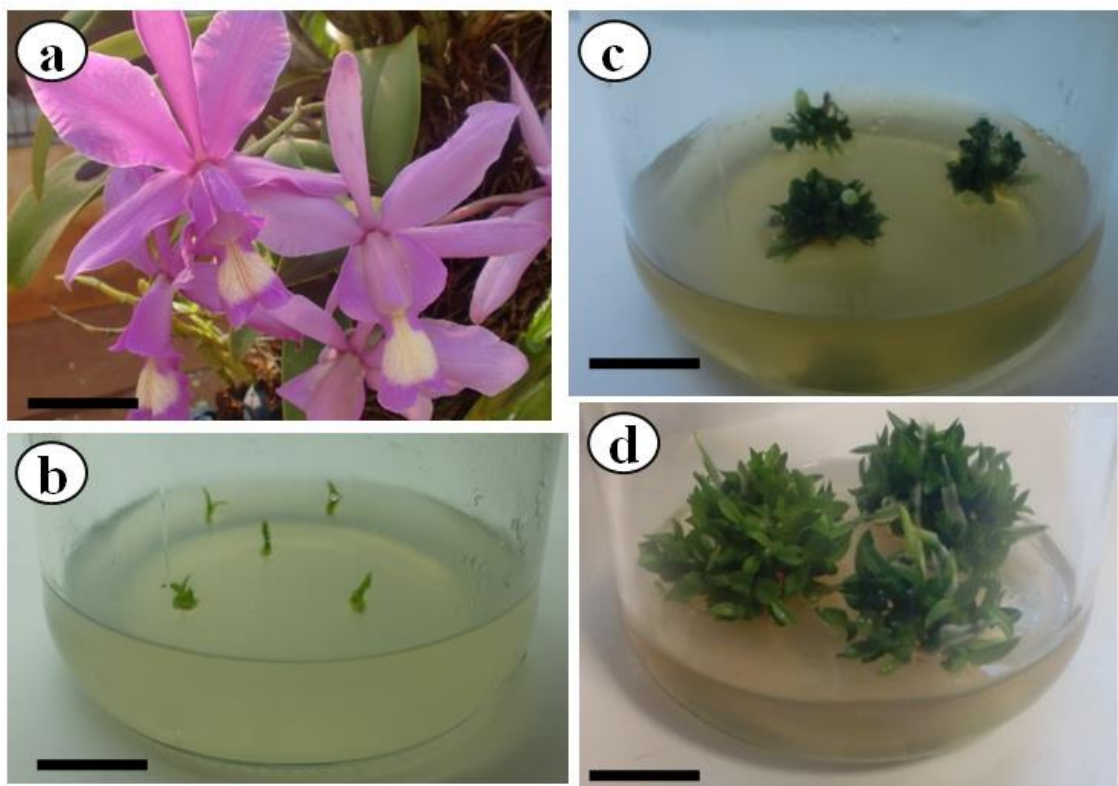


FIGURA 1. a) Planta de *Cattleya nobilior* com flores barra = 2,0 cm. b) Brotos de plantas de *C. nobilior* cultivados *in vitro* barra = 2,0 cm. c) Plantas de *C. nobilior* produzidas aos 90 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS enriquecido com 25% de água de coco barra = 2,0 cm. d) Plantas de *C. nobilior* produzida aos 180 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS enriquecido com 25% de água de coco barra = 2,0 cm.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcelas subdivididas, sendo alocados nas parcelas os dois tempos de cultivo e nas subparcelas as concentrações de água de coco acrescidas ao meio de cultivo, com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo cada.

Para as análises estatísticas foi utilizado o aplicativo computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010) e todos os dados foram avaliados mediante análise de variância e, havendo significância do efeito da água de coco foram ajustadas equações de regressão (BANZATTO e KRONKA, 1992).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo de cultivo atuou significativamente ($p < 0,05$) sobre a porcentagem da massa fresca da parte aérea (%MFPA) e sobre as porcentagens de massa fresca (%MFR) e seca (%MSR) das raízes. Houve efeito isolado da água de coco ($p < 0,05$) apenas sobre a massa fresca (MF) e seca (MS) dos brotos. Efeito conjunto ($p < 0,05$) de ambos os fatores foi observado sobre a %MFPA, %MFR, %MSPA e %MSR (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da massa fresca (MF), porcentagem da massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR), massa seca (MS), porcentagem de massa seca da parte aérea (%MSPA) e das raízes (%MSR), de brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.

F.V.	G.L.	Quadrados médios					
		MF	%MFPA	%MFR	MS	%MSPA	%MSR
TC	1	0,16 ^{ns}	0,60*	2,87**	0,03 ^{ns}	2,13 ^{ns}	9,46*
Erro 1	4	0,03	0,06	0,11	0,33	0,29	1,10
AC	4	0,54**	0,04 ^{ns}	0,12 ^{ns}	2,00*	0,34 ^{ns}	2,18 ^{ns}
TC x AC	4	0,14 ^{ns}	0,64*	4,52*	0,78 ^{ns}	0,89**	5,03*
Erro 2	16	0,06	0,15	1,12	0,50	0,18	0,83
CV(%)		0,24	4,25	28,88	0,07	4,68	22,93
M.Geral		0,03g	86,19%	13,81%	0,002g	83,29%	16,71%

** significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; * significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F; ^{ns} não significativo

A adição de água de coco aos meios de cultura favoreceu a produção de biomassa de *C. nobilior*, de maneira que o aumento da concentração deste aditivo resultou em aumento nos valores de MF e MS dos brotos, independentemente do tempo de cultivo (Figura 2a e 2b, respectivamente).

Os efeitos benéficos da água de coco sobre a massa fresca e seca também foram observados no cultivo *in vitro* de outras espécies de orquídeas. Para plantas do híbrido *Calanthe* 'Bukduseong' x 'Hyesung', a adição de 50 mL L⁻¹ de água de coco em meio Hyponex modificado, após oito semanas de cultivo, resultou em valores de massa fresca e seca da parte aérea e das raízes, estatisticamente superiores quando comparados ao controle (BAQUE et al., 2011). O cultivo de protocormóides (PLBs - protocorm like bodies) do híbrido *Dendrobium* Alya Pink, em meio de cultura MS ½ contendo 10% e 20% de água de coco, também resultou nos maiores valores de massa fresca, quando comparados ao controle (NAMBIAR e MAZIAH, 2012).

Plantas do híbrido de *Cattleya labiata* x *Cattleya forbesii* também apresentaram maior massa fresca quando cultivadas por seis meses em meio MS com metade da concentração de macronutrientes e acrescido de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, suplementado com 100 ml L^{-1} de água de coco e 100 g L^{-1} de polpa de banana, quando comparadas ao controle (VIEIRA et al., 2009).

Provavelmente, a adição de água de coco no meio de cultura resultou em aumento da massa fresca e seca dos brotos de *C. nobilior* por possuir substâncias que estimulam as células a iniciarem e manterem-se em um ciclo de divisões celulares (PYATI et al., 2002; TAIZ e ZEIGER, 2008), proporcionando, desse modo, maior produção e acúmulo de biomassa dos brotos quando comparada ao controle. Dentre as substâncias promotoras do crescimento, foram identificadas na água de coco algumas citocininas, entre elas a zeatina – O – glicosídeo e a dihidrozeatina – O – glicosídeo (GE et al., 2004), as quais estimulam a divisão celular (TAIZ e ZEIGER, 2008). A presença de açúcares na água de coco (RITCHER et al., 2005) também pode ter contribuído para o aumento na biomassa das plantas de *C. nobilior*, uma vez que segundo RIEK et al. (1997), 75 a 85% do aumento da biomassa deve-se à incorporação de carbono nos tecidos, sendo reflexo de uma maior absorção de nutrientes incluindo a sacarose (ISLAM et al., 1999).

Embora a massa fresca tenha sido influenciada pela concentração de água de coco, a %MFPA e %MFR foram influenciadas apenas pelo tempo de cultivo (Quadro 1), de maneira que os maiores valores de %MFPA foram observados aos 180 dias de cultivo (Figura 2c) enquanto que para a %MFR, o cultivo aos 90 dias foi o que proporcionou as maiores médias (Figura 2d).

Os maiores valores de %MSPA foram obtidos aos 180 dias de cultivo, independentemente da água de coco e, aos 90 dias de cultivo, com a adição de 25% de água de coco ao meio de cultura (Figura 2e). No entanto os maiores valores de %MSR foram observados aos 90 dias de cultivo e na ausência de água de coco, sendo que aos 180 dias de cultivo, os valores foram estatisticamente menores (Figura 2f).

Provavelmente, a adição de água de coco influenciou a %MSPA dos brotos apenas nos primeiros 90 dias de cultivo porque nesse período as plantas apresentaram maior demanda por substâncias estimuladoras do crescimento, como citocininas, que foram supridas pela adição de água de coco aos meios de cultura. Entretanto, após o subcultivo das plantas por mais 90 dias, não houve variação da %MSPA entre os

tratamentos provavelmente, porque o conteúdo endógeno dessas substâncias foi suficiente para promover o crescimento e posterior alocação de biomassa dos brotos.

De modo geral, as plantas de *C. nobilior* investiram mais na produção de biomassa da parte aérea do que das raízes (Figura 2c, 2d, 2e, 2f). Segundo o modelo de partição de fotoassimilados de Thornley citado por Marschner et al (1996), o crescimento das plantas é dependente do fluxo de carbono da parte aérea para as raízes e do fluxo de nitrogênio das raízes para a parte aérea.

Dessa forma, sugere-se que as respostas das plantas de *C. nobilior* devem-se à maior concentração de nitrogênio fornecida pela água de coco, que é constituída por fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas (KRIKORIAN, 1991; CALDAS et al., 1998; RITCHER et al., 2005; GNASEKARAN et al., 2012).

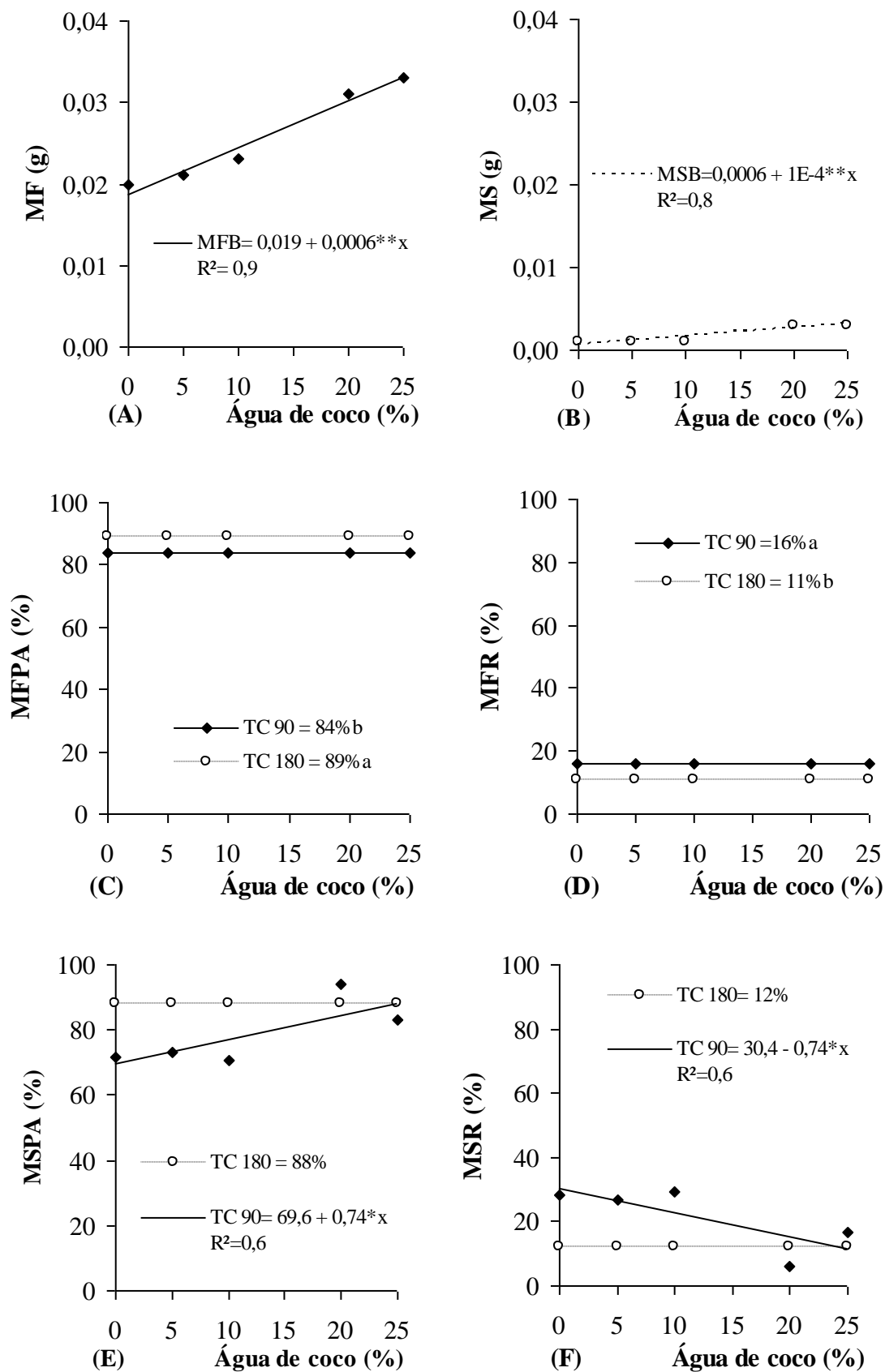


FIGURA 2. Efeito conjunto da água de coco e do tempo de cultivo sobre a massa fresca (a), massa seca (b), porcentagem de massa fresca da parte aérea (c) e das raízes (d) e

porcentagem de massa seca da parte aérea (e) e das raízes (f) de brotos de *Cattleya nobilior* Rchb. f. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Foi observada interação significativa da água de coco e do tempo de cultivo sobre o número de raízes dos brotos (NR) de *C. nobilior* ($p < 0,01$). Para o comprimento das raízes (CR) e para o número de brotos (NB) houve efeito apenas do tempo de cultivo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Por outro lado, houve efeito da água de coco sobre o comprimento da parte aérea dos brotos (CPA) ($p < 0,01$). Em relação ao número de folhas, não houve efeito significativo dos tratamentos e as plantas produziram em média quatro folhas por broto (Quadro 2).

QUADRO 2. Resumo das análises de variância do comprimento da parte aérea (CPA) e as raízes (CR), do número de folhas (NF) e de raízes (NR) dos brotos (NB) e número total de brotos por planta de *Cattleya nobilior* Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.

F.V.	G.L.	Quadrados médios				
		NR	CR	NF	CPA	NB
TC	1	15,45**	17,86*	6,75 ^{ns}	7,61 ^{ns}	208,52**
Erro 1	4	0,17	1,79	14,91	1,19	3,00
AC	4	1,76*	4,85 ^{ns}	8,54 ^{ns}	3,47**	3,48 ^{ns}
TC x AC	4	4,13**	7,52 ^{ns}	28,84 ^{ns}	1,22 ^{ns}	5,19 ^{ns}
Erro 2	16	0,44	2,95	11,60	0,49	2,49
CV(%)		5,14	4,27	4,81	1,66	26,58
M.Geral		0,68	0,62cm	4,03	0,79cm	44,08

** significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; * significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F
^{ns} não significativo

O maior NR por broto foi observado aos 90 dias de cultivo na ausência de água de coco. Aos 180 dias de cultivo, foi observada uma tendência de aumento do NR com a adição de água de coco no meio de cultura, entretanto, os valores obtidos neste período de cultivo foram significativamente inferiores aos observados após 90 dias de cultivo (Figura 3a).

A água de coco também não promoveu o aumento no número de raízes de plantas do híbrido de *Calanthe* 'Chunkwang' x 'Hyesung' cultivadas em meio Hyponex modificado (BAQUE et al., 2011). No entanto, para plantas do híbrido *Dendrobium* Alya Pink, a adição de água de coco em meio MS ½ beneficiou o sistema radicular (NAMBIAR e MAZIAH, 2012) e para o híbrido de *Calanthe* 'Bukduseong' x 'Hyesung', o aumento da concentração de água de coco de 10 mL L⁻¹ para 50 mL L⁻¹, em meio Hyponex modificado, resultou em aumento do número de raízes (BAQUE et al., 2011).

Em relação ao CR, os maiores valores foram obtidos aos 180 dias de cultivo, independentemente da concentração da água de coco. Aos 90 dias de cultivo, o CR dos brotos de *C. nobilior* foi em média 0,6 cm. Aos 180 dias de cultivo, foi observado um aumento de 16,6% sobre esta característica (Figura 3b).

A proliferação e o crescimento das raízes dependem da disponibilidade de água e nutrientes no microambiente que circunda a raiz, ocorrendo em resposta à busca de nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas (SILVA, 2003; TAIZ e ZEIGER, 2008). Nesse sentido, sugere-se que a adição de água de coco ao meio de cultura não beneficiou a formação e o crescimento das raízes de *C. nobilior* em ambos os períodos de cultivo, por ter estimulado o desenvolvimento da parte aérea, e também por ter proporcionado um ambiente rico em substâncias nutritivas, não sendo necessário o desenvolvimento de um extenso sistema radicular para a busca de nutrientes.

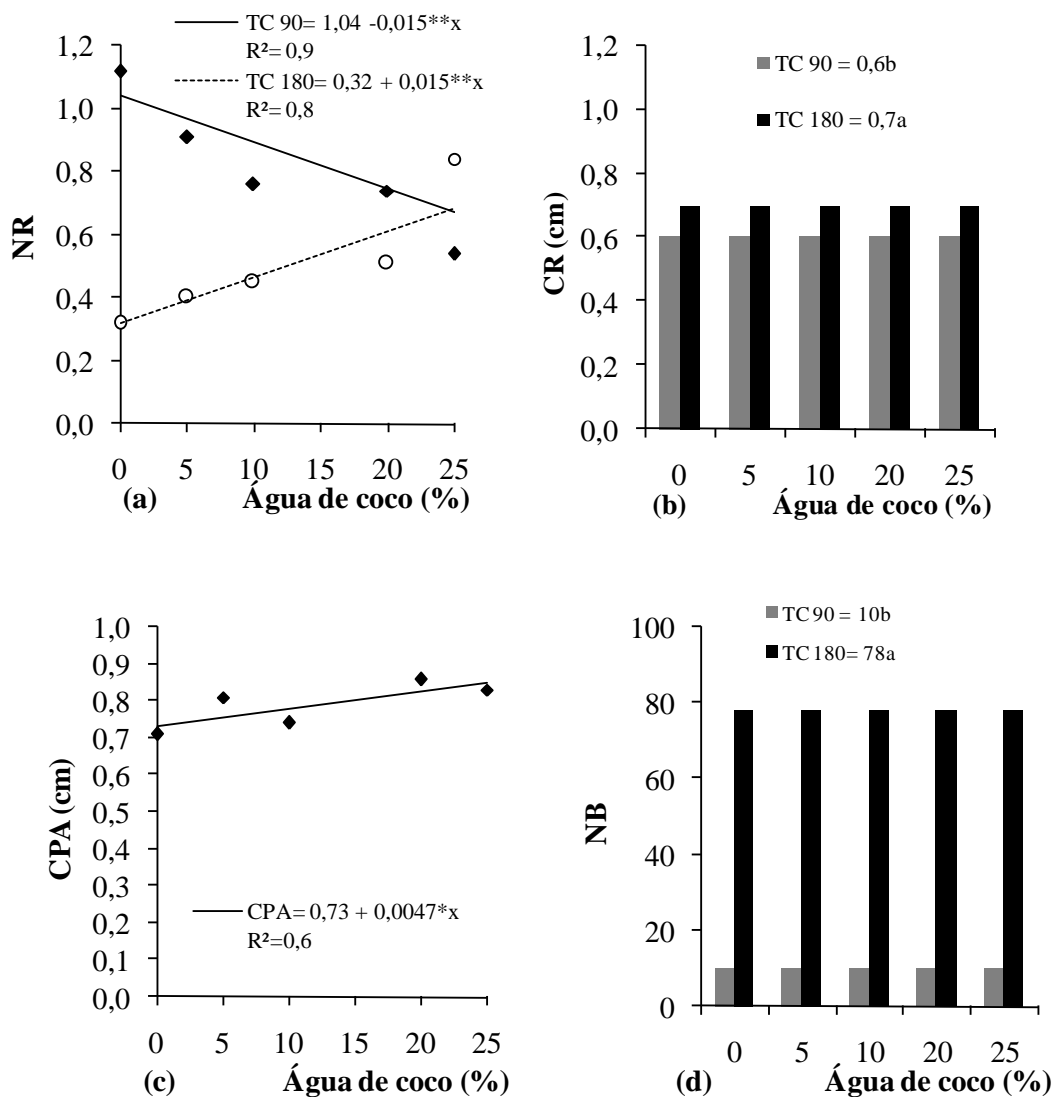


FIGURA 3. (a) número de raízes dos brotos; (b) comprimento das raízes dos brotos; (c) comprimento da parte aérea dos brotos e (d) número total de brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f.. UFGD, Dourados-MS, 2013.

Ao contrário do que foi observado para o NR e CR, a adição de água de coco beneficiou o CPA dos brotos de *C. nobilior*, de maneira que os maiores valores foram obtidos na maior concentração utilizada (Figura 3c). Efeitos benéficos da água de coco sobre o crescimento da parte aérea também foram observados para híbridos de *Calanthe* cultivados em meio Hyponex modificado (BAQUE et al., 2011). Para protocormos de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. cultivados em meio VW, o uso de 10% de água de coco estimulou a elongação de protocormos (SINHA e ROY, 2004).

O aumento do CPA de plantas cultivadas *in vitro*, na presença de água de coco, é relatado por (GE et al., 2004) devido às citocininas, sais minerais, ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas e outros fitormônios (GNASEKARAN et al., 2012), que estimulam o crescimento das plantas.

Para o NB, houve efeito significativo apenas do tempo do tempo de cultivo (Quadro 2), sendo os maiores valores obtidos aos 180 dias, independentemente da água de coco (Figura 3d).

Segundo FARIA et al (2012), para a multiplicação *in vitro* de orquídeas é necessária a adição de citocininas ao meio de cultura, pois essas irão induzir os processos morfogênicos, estimulando, dessa forma, a formação de brotos. Entretanto, à semelhança do que foi observado para o híbrido de *C. labiata* x *C. forbesii* (VIEIRA et al., 2009) a água de coco não influenciou a formação de brotos de *C. nobilior*, o que permite inferir que a formulação original do meio de cultura utilizado, isento de água de coco é suficiente para estimular a formação de brotos de *C. nobilior*.

4 – CONCLUSÃO

O acúmulo de biomassa de *Cattleya nobilior* foi favorecido pela adição de 25% de água de coco ao meio de MS, enquanto que a ausência de água de coco promoveu maior desenvolvimento do sistema radicular.

O cultivo da espécie, por 180 dias, propicia maior número de brotos com maior comprimento tanto de parte aérea como de raízes.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ceres**, Viçosa, v.53, n.310, p. 608-613, 2006.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: Funep, 1995. 247p.
- BAQUE, M. A.; SHIN, Y. K.; ELSHMARI, T.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukdusong' x 'Hyesung' and 'Chunkwang' x 'Hyesung'). **Australian Journal of Crop Science**, Sydney, v.5, n.10, p.1247-1254, 2011.
- BARROS, F. D; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20010> > Acesso em: 29 out. 2013.
- BASKER, S.; BAI, V. N.; Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D.Don) Schltr. via pseudobulb segment cultures. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v.6, p.31-35, 2006.
- BIANCHETTI, L. B.; *Cattleya nobilior* Rchb.f. **Heringeriana**, Brasília, v.1, n.1, p.9-10, 2007.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1998. p.87-134.
- COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. (ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p.351-370.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012. 124p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR** – Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras – MG: UFLA, 2010.
- GE, L.; YOUNG, J. W. H.; TAN, S. N.; YANG, X. H.; ONG, E. S. Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1048, n.1, p.119-126, 2004.
- GNASEKARAN, P.; POOBATHY, R.; MAHMOOD, M.; SAMIAN, M. R.; SUBRAMANIAM, S. Effects of complex organic additives on improving the growth of

PLBs of *Vanda* Karsem's Delight. **Australian Journal of Crop Science**, Sydney, v.6, n.8, p.1245-1248, 2012.

GONÇALVES, L. M.; PRIZÃO, E. C.; GUTIERRE, M. A. M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of *Hadrolaelia purpurata* (= *Laelia purpurata*) and *Encyclia randii* orchids. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.34, n.4, p.459-463, 2012.

HUANG, L. C.; LIN, C. J.; KUO, C. I. Paphiopedilum cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.91, p.111-121, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423801002400> > Acesso: 4 jan. 2013.

ICHIHASHI, S.; ISLAM, M. O. Effect of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Kyoto, v.68, p.269-274, 1999.

ISLAM, M. O.; MATSUI, S.; ICHIHASHI, S.; Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids *in vitro*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v.68, n.6, p.1132-1138, 1999.

KAUR, S.; BHUTANI, K. K. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. **Horticultural Science**, Praga, v.39, n.1, p.47-52, 2012.

KRIKORIAN, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 66p.

MARSCHNER, H.; KIRKBY, E. A.; CAKMAK, I. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1255-1263, 1996.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. Instrução normativa n. 6 de 23 de setembro de 2008. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>. > Acesso: 14 jan. 2013.

MUKARLINA.; LISTIAWATI, A.; MULYANI, S. The effect of coconut water and naphthalene acetic acid (NAA) application on the *in vitro* growth of *Paraphalaenopsis serpentilingua* from West Kalimantan. **Bioscience**, v.2, n.2, p.62-66, 2010. Disponível em: < <http://biosains.mipa.uns.ac.id/N/N0202/N020202.pdf> >. Acesso: 4 jan. 2013.

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

NAMBIAR, N.; TEE, C. S.; MAZIAH, M. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm-like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. **Plant Omics Journal**, Sydney, v.5, n.1, p.10-18, 2012.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320p.

PUCHOOA, D. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v.6, n.5, p. 884-888, 2004.

PYATI, A. N.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl. – A threatened orchid. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.40, p.620-623, 2002.

RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.47, p.269-278, 1997.

RITCHER, E. M.; JESUS, D. P.; MUÑOZ, R. A. A.; LAGO, C. L.; AGNES, L. Determination of anions, cations, and sugars in coconut water by capillary electrophoresis. **Journal of the Brazilian of the Chemical Society**, Unicamp, v. 16, n.6A, p. 1134-1139, 2005.

ROBERTS, C. L.; ALVARADO, G. V.; SÁNCHEZ, B. M.; FRANCO, J. B.; LLANOS, M. A.; PORTUGAL, J. Q. Orchid's micropropagation for to the sustainable management of native species from parquet nacional y area natural de manejo integrado cotopata (PN – ANMI Cotopata), La Paz – Bolivia. **Lankesteriana**, v.7, n.1-2, p.299-302, 2007.

RODRIGUEZ, D. P.; BARROS, F.; DAMASCENO JUNIOR, G. A.; BORTOLOTTI, I. M. Levantamento da família Orchidaceae no Morro Santa Cruz, municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v.36, n.4, p.613-636, 2009.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliacattleya Amber Glow***. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

SINHA, P.; ROY, S.K. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through *in vitro* culture. **Plant Tissue Culture**, v.14, n.1, p.55-61, 2004. Disponível em: < http://baptcb.org/ptc/Full_article/ptc14_1_07.pdf >. Acesso: 4 jan. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819p.

VENTURA, G. M.; **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. 2007. 110f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T.; AGUIAR, R. S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48-52, 2009.

EXPERIMENTO 2

Efeito de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de plantas de *Cattleya nobilior*

1 - INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de Angiospermas, sendo constituída por aproximadamente 35.000 espécies e 800 gêneros, que se distribuem no planeta, excetuando-se as regiões polares e desérticas (DRESSLER, 1993). Destaca-se na floricultura pela beleza, exotismo, diversidade de cores, tamanhos e formas das flores, e por algumas espécies serem fornecedoras de aromas e outros componentes utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos (FARIA et al., 2012).

Para a produção de mudas a partir de clonagem, o uso das técnicas de cultura de tecidos, tem ampliado sua importância industrialmente, ao possibilitar a multiplicação rápida e massiva de genótipos de interesse comercial (KUMARIA e TANDON, 2001), ao contrário da técnica de divisão de rizomas, que além de vagarosa, resulta na produção de poucas mudas (BHADRA e HOSSAIN, 2003).

Porém, com a destruição contínua dos habitats, a preocupação com a conservação de espécies de orquídeas tem aumentado nos últimos anos tornando a propagação por sementes a alternativa mais eficaz para preservação da biodiversidade, suprimindo também, a necessidade dos produtores de orquídeas na aquisição de mudas (STANCATO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2006; STEWART e KANE, 2006).

Neste contexto, o cultivo *in vitro* tem sido empregado para a germinação das sementes de orquídeas, resultando em maiores percentuais de germinação, quando comparada à germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbiontes muitas vezes espécie-específica (STANCATO et al., 2001).

Após a germinação das sementes, várias etapas de cultivo *in vitro* são necessárias para que as plantas formadas sejam aclimatizadas e, posteriormente comercializadas, sendo necessário, dessa forma, que os meios de cultura utilizados sejam enriquecidos com substâncias que estimulem o crescimento (KRAPIEC et al., 2003; COSTA et al., 2009).

Nesse contexto, a composição e concentração hormonal no meio de cultura são fatores determinantes do crescimento e da morfogênese na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998; BORGATTO e HAYASHI, 2002). O uso de auxinas como o ácido naftalenoacético (ANA) e citocininas como a 6-benzilaminopurina (BAP), tem sido relatado por vários autores para estimular a proliferação de brotos de orquídeas bem como para acelerar o crescimento em altura e a formações de raízes (PEREZ et al., 1999; BHADRA e HOSSAIN, 2003; BASKER e BAI, 2006; GIATTI e LIMA, 2007).

Entre as espécies de orquídeas que ocorrem no Estado de Mato Grosso do Sul, *Cattleya nobilior* Rchb.f. destaca-se por seu elevado valor florístico e rusticidade. É uma espécie de orquídea epífita e/ou rupícola que produz flores róseo-lilases, muito atrativas. Por esse motivo, a espécie tem sido submetida à pressão de coleta voltada para a comercialização (POTT e POTT, 1994; BIANCHETTI, 2007) e apesar de não ser considerada ameaçada de extinção, encontra-se na lista das espécies cujas informações são ainda deficientes (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008). Desse modo, qualquer iniciativa voltada para a conservação da espécie deve ser valorizada (BIANCHETTI, 2007).

Apesar do cultivo comercial de várias espécies do gênero *Cattleya* representar uma atividade de grande importância econômica no agronegócio florícola mundial (ZANENGA-GODOY e COSTA, 2003), poucos trabalhos relatam protocolos para cultivo *in vitro* de plantas de *Cattleya* obtidas a partir de germinação assimbiótica.

Assim, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o crescimento *in vitro* de plantas de *C. nobilior* em função da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e BAP.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados – MS, de novembro de 2011 a março de 2012.

Foram utilizados como explantes brotos extraídos de plantas de *Cattleya nobilior* oriundas de germinação *in vitro*, em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, geleificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e pH ajustado para 5,8 ± 0,1, cultivadas em sala de crescimento sob 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e luminosidade de 20 μmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W cada.

Sob condições assépticas, dois brotos com aproximadamente 0,8 cm de altura, três folhas e desprovidos de raízes, foram destacados das plantas de origem e inoculados em frascos transparentes com capacidade para 50 mL e providos de tampas plásticas. Cada frasco continha 10 mL de meio de cultura MS ½, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e enriquecido com BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 com KOH (1M) antes da esterilização em autoclave a 120° C e 1,0 atm durante 20 minutos. Após a inoculação dos brotos, as culturas foram mantidas por quatro meses em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20 μmol m⁻² s⁻¹ produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W cada.

Após 120 dias de cultivo as culturas foram retiradas dos frascos e, a seguir, foram lavadas em água corrente e avaliadas quanto ao número de brotos por planta. Em seguida, os brotos de cada planta foram separados e avaliados quanto ao número de folhas e raízes, comprimento da parte aérea e das raízes, massa fresca e porcentagens de massa fresca da parte aérea e das raízes.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 5x4 com quatro repetições constituídas de um frasco de cultivo cada. Para as análises estatísticas foi utilizado o aplicativo computacional SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010) e todas as variáveis foram avaliadas mediante análise de variância e, havendo significância às médias foram ajustadas equações de regressão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os reguladores de crescimento atuam em conjunto ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) sobre a porcentagem de sobrevivência (%SOB) e sobre o número de brotos (NB) de *Cattleya nobilior*. Efeito isolado ($p < 0,05$) do ANA foi observado sobre o número de folhas (NF) e sobre o comprimento da maior raiz dos brotos (CMR). Em relação ao BAP, houve efeito significativo deste regulador ($p < 0,01$) sobre o CMR, sobre o número de folhas (NF) e sobre a porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR) (Quadro 3).

Por outro lado, não houve efeito significativo ($p > 0,01$) dos reguladores sobre a porcentagem de folhas vivas (%FV) e mortas (%FM), sobre o comprimento da parte aérea (CPA) e sobre a porcentagem de brotos vivos (%BV) e mortos (%BM). Dessa maneira, independentemente da adição de reguladores, as plantas de *C. nobilior*, tiveram em média 1,9 cm de comprimento, e apresentaram um percentual de folhas e brotos vivos de 92% e 98,5%, respectivamente e um percentual de folhas e brotos mortos de 8% e 1,5%, respectivamente (Quadro 3).

QUADRO 3. Resumo das análises de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB), número de brotos (NB) e de folhas por brotos (NF), porcentagem de folhas vivas (%FV) e mortas (%FM) por broto, comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CMR) do broto, número de raízes por broto (NR), porcentagem de brotos vivos (%BV) e mortos (%BM) por planta, massa fresca dos brotos (MF), porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR) dos brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Quadrados médios								
F.V.	G.L.	%SOB	NB	NF	%FV	%FM	CPA	CMR
ANA	3	1,19 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,14*	0,07 ^{ns}	1,28 ^{ns}	2,05 ^{ns}	0,21*
BAP	4	1,58 ^{ns}	1,43 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,96 ^{ns}	1,63 ^{ns}	1,14**
BAP x ANA	12	2,45**	1,16*	0,08 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Erro	40	0,63	0,55	0,04	0,20	1,41	1,56	0,06
CV(%)		8,47	21,11	9,41	4,73	2,62	7,42	17,02
M. geral		87,2%	12,0	4,3	92,0%	8,0%	1,9cm	1,3cm

F.V.	G.L.	NR	%BV	%BM	MF	%MFPA	%MFR
ANA	3	0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,64 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,93 ^{ns}	3,48 ^{ns}
BAP	4	0,74**	0,03 ^{ns}	0,48 ^{ns}	4,79 ^{ns}	8,96**	38,82**
BAP x ANA	12	0,05 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,71 ^{ns}	3,79 ^{ns}	0,45 ^{ns}	2,46 ^{ns}
Erro	40	0,02	0,07	0,78	1,90	0,57	1,95
CV(%)		12,86	2,69	7,66	1,33	8,20	2,33
M. geral		0,8	98,5%	1,5%	0,08g	85,5%	14,5%

** significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; * significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F
^{ns} não significativo

Houve efeito conjunto do ANA e do BAP sobre a %SOB de *C. nobilior* apenas com a utilização de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP resultou em valores crescentes de %SOB à medida que as concentrações de ANA aumentaram. Por outro lado, efeito inverso foi observado com a utilização de 4,0 mg L⁻¹ de BAP, de maneira que a maior %SOB (100%) foi registrada na ausência de ANA e os menores valores observados com o aumento da concentração de ANA (Figura 4).

A ausência de BAP propiciou 86% de sobrevivência e as concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ desse regulador de crescimento propiciaram porcentagem de sobrevivência igual a 93% não apresentando variações em função das concentrações de ANA analisadas (Figura 4).

Dessa forma, pode-se sugerir que a adição de BAP ao meio de cultura favorece a sobrevivência das plantas de *C. nobilior*, entretanto, o aumento da concentração de 2,0 mg L⁻¹ para 4,0 mg L⁻¹ de BAP pode resultar em diferentes respostas em função da concentração de ANA.

Efeito benéfico da concentração de BAP sobre a sobrevivência também foi obtido por GIATTI e LIMA (2007) ao cultivarem gemas de brotações laterais de plantas de *Blc* Owen Holmes Ponkan x *Brassavola digbiana* n^o 2. Os autores obtiveram 100% de sobrevivência quando os explantes foram cultivadas por 18 dias na presença de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP em meio MS líquido acrescido de 1,5 mL de água de coco e 0,1 mg L⁻¹ de ANA.

KUMARI et al. (2013) obtiveram 100% de sobrevivência de segmentos nodais de *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' cultivados em meio MS ½ acrescido de BAP nas concentrações de 1,0; 2,0 ou 4,0 mg L⁻¹. Entretanto, quando a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA foi utilizada, houve redução da porcentagem de sobrevivência para 66,67%.

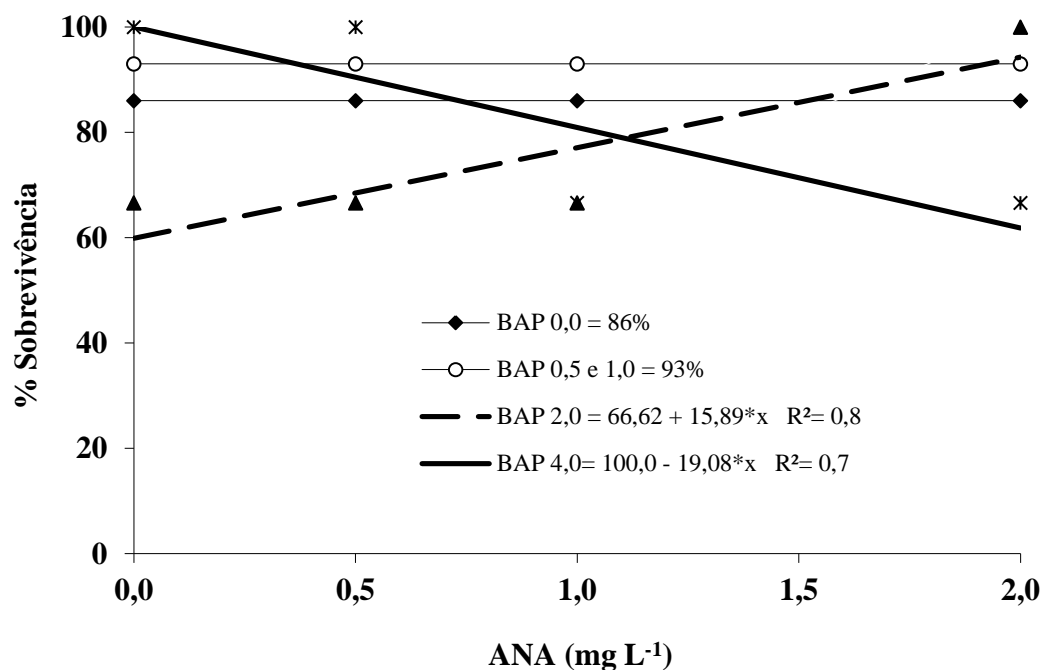


FIGURA 4. Porcentagem de sobrevivência (%SOB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f. observada em função das concentrações de ANA e BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.

Houve formação de brotos de *C. nobilior* em todos os tratamentos estudados, mesmo na ausência de reguladores de crescimento. No entanto, a adição de BAP ao meio de cultura resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) na proliferação dos brotos (Figura 5).

Concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP não propiciaram variações no número de brotos (NB) entre as concentrações de ANA, e os resultados obtidos foram estatisticamente superiores aos observados na ausência de reguladores. No entanto, os maiores valores de NB (19,3 e 19,7) foram observados com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP na ausência de ANA ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de ANA, respectivamente. A adição de 4,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA resultou na formação de 15,3 brotos por planta (Figura 5).

O efeito do BAP em estimular a formação de brotos de orquídeas tem sido relatado por vários autores. BASKER e BAI (2006), ao cultivarem segmentos de pseudobulbos de *Coelogyne stricta* (D.Don) Schltr em meio MS ½, observaram maior formação de brotos com o aumento da concentração de BAP de 0,5 a 2,0 mg L⁻¹. PEREZ et al. (1999) também verificaram que o aumento da concentração de BAP de 0,005 a 5,0 µmol. L⁻¹ resultou em aumento significativo da porcentagem de brotos originários ápices de raízes de *Catasetum fimbriatum* Lindl. cultivadas em meio VW.

Os resultados apresentados, provavelmente são devidos à função das citocininas em estimular a divisão celular e a quebra de dominância apical (STADEN et al., 2008; TAIZ e ZEIGER, 2008), favorecendo desta forma, a emissão de novos brotos (MOK et al., 2000).

A adição combinada de BAP e ANA também tem sido utilizada por vários autores para promover a formação de brotos. BHADRA e HOSSAIN (2003) ao cultivarem porções apicais de mini rizomas de *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. em meio MS, obtiveram maior número de brotos (4 a 5) nos meios acrescidos com 2,5 mg L⁻¹ de BAP ou com 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Para plantas de *C. walkeriana* Gardner produzidas a partir de germinação assimbiótica, o meio B5 suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA, proporcionou maior número de brotos (2,44) quando comparado ao controle (KRAPIEC et al., 2003). Para o híbrido *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’ o cultivo de segmentos nodais em meio contendo 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ de ANA resultou no maior número de brotos quando comparado ao controle (KUMARI et al., 2013).

Segundo MACHAKOVA et al. (2008) uma concentração baixa de auxina é sempre benéfica quando combinada com altos níveis de citocinina durante a multiplicação de brotos, embora em alguns casos, a adição isolada de citocininas seja suficiente, como foi observado no presente trabalho.

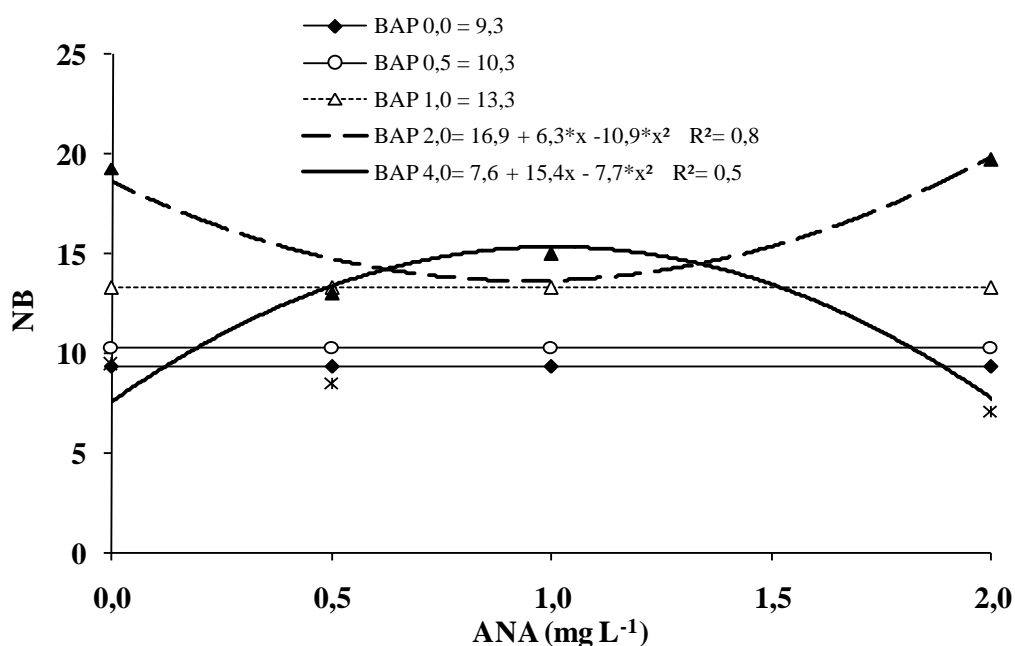


FIGURA 5. Número de brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f. observado em função das concentrações de ANA e BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.

O maior NF (5,1) foi observado na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Figura 6). KRAPIEC et al. (2003) também observaram maior formação de folhas de *C. walkeriana* em meio de cultura contendo maior concentração de auxinas.

Acredita-se que as auxinas atuam na regulação da formação das folhas, atuando na iniciação foliar bem como na elaboração da morfologia foliar e das redes vasculares (SCARPELLA et al., 2010). Nesse sentido, o maior NF observado no presente trabalho pode ser devido ao papel do ANA em estimular a formação de novas folhas de *C. nobilior*, e a concentração de 0,5 mg L⁻¹ foi suficiente para a promoção do estímulo.

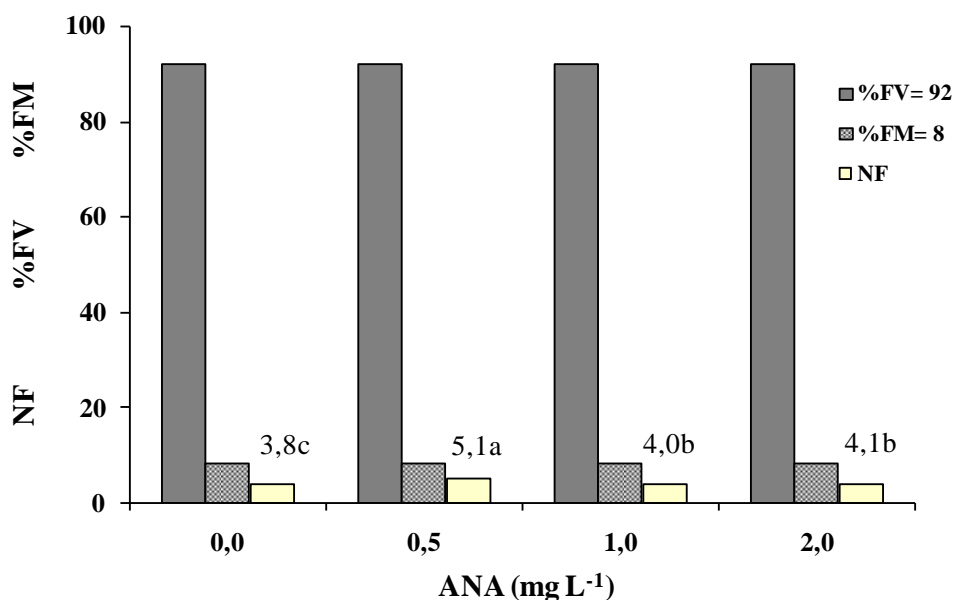


FIGURA 6. Número de folhas (NFP), porcentagem de folhas vivas (%FV) e mortas (%FM) por broto de *Cattleya nobilior* Rchb.f. observados em função das concentrações de ANA. UFGD, Dourados – MS, 2013. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Tukey, 5% de probabilidade).

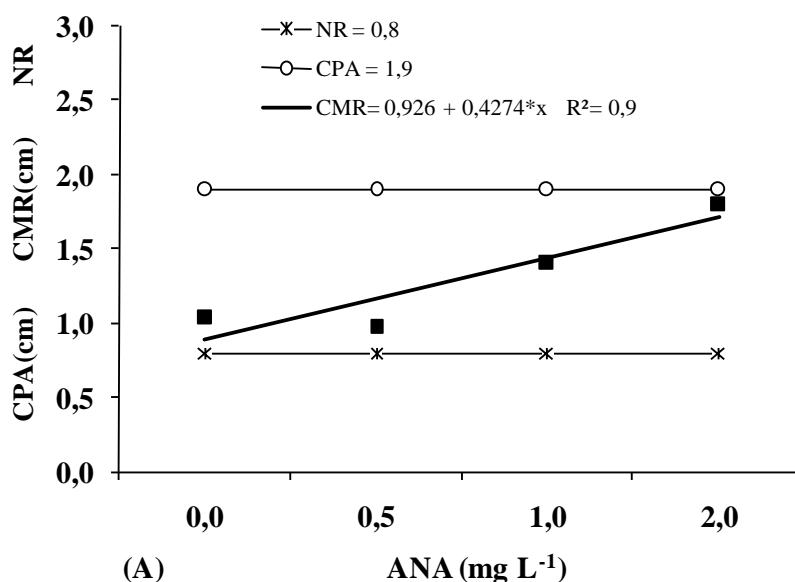
A adição de ANA ou BAP ao meio de cultura não influenciou o comprimento da parte aérea (CPA) dos brotos, que apresentaram, em média, 1,9 cm (Figura 7 a e b).

Plantas de *Zygopetalum intermedium* cultivadas em MS suplementado com diferentes combinações entre BAP (0,5 mg L⁻¹), ANA (0,1 mg L⁻¹) e triacantanol (0,25 ou 0,5 mg L⁻¹) também não apresentaram variação no comprimento da parte aérea

(NAGARAJU e MANI, 2005). BASKER e BAI (2006) obtiveram brotos de *C. stricta* com mais de 3,5 cm de comprimento após o cultivo por 90 dias em meio MS ½ acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de ANA ou na combinação de 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP. BHADRA e HOSSAIN (2003) observaram aumento no comprimento da parte aérea de plantas de *G. densiflorum* quando cultivadas em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de ANA, ou em meio MS contendo apenas 2,5 mg L⁻¹ de BAP.

Os resultados apresentados bem como os relatados na literatura mostram que o efeito dos reguladores de crescimento sobre o comprimento da parte aérea varia com a espécie utilizada.

Segundo TAIZ e ZEIGER (2008), as auxinas têm importante papel no crescimento de caules ao promoverem o alongamento celular, entretanto, se o nível de auxina endógena na região de alongamento de uma planta sadia normal está próximo do ótimo para o crescimento, a adição de auxina exógena resulta em um modesto e breve estímulo no crescimento, podendo até ser inibitório. Dessa forma, pode-se sugerir que as concentrações de ANA utilizadas no presente trabalho não foram suficientes em estimular o alongamento dos brotos de *C. nobilior*.



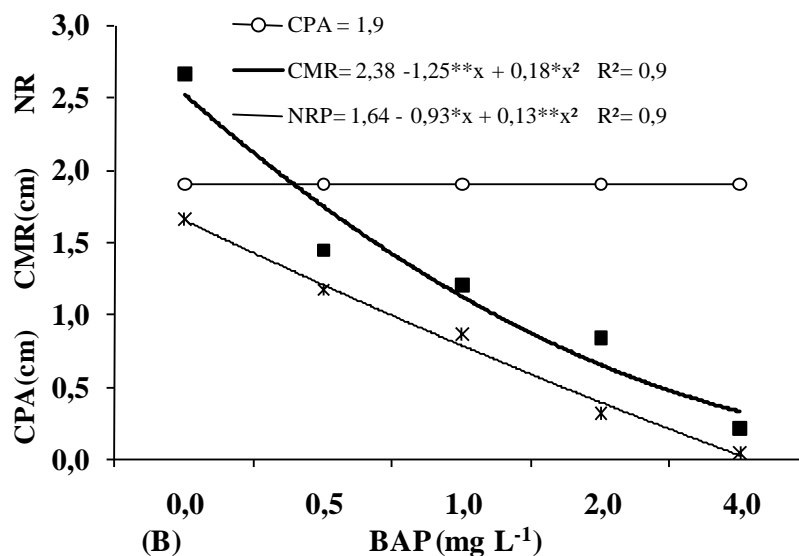


FIGURA 7. Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR) e número de raízes (NR) por broto de *Cattleya nobilior* Rchb.f. observados (A) em função das concentrações de ANA; (B) em função das concentrações de BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.

A utilização de ANA não influenciou o número de raízes (NR) que foi de 0,8 por broto (Figura 7A), e o aumento das concentrações de BAP foram prejudiciais à essa variável (Figura 7B). No entanto, o aumento da concentração de ANA promoveu o crescimento da maior raiz (Figura 7A), enquanto que o aumento da concentração de BAP propiciou a sua redução (Figura 7B).

Para brotos de *C. stricta* obtidos de segmentos de pseudobulbos, a adição de 2,0 mg L⁻¹ de ANA em meio MS ½ também resultou em maior comprimento de raízes (3,2 cm) quando comparado ao controle (BASKER e BAI, 2006).

Geralmente, atribui-se às auxinas o papel de formação de raízes adventícias a partir de uma grande variedade de tecidos, dada a sua capacidade de estimular a divisão, a alongação e a diferenciação das células (WOTAVOVÁ-NOVOTNÁ et al., 2007; TAIZ e ZEIGER, 2008), entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que as concentrações de ANA utilizadas foram eficientes em estimular apenas o aumento no crescimento das raízes.

Em relação ao efeito das citocininas sobre o desenvolvimento radicular, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura, uma vez que segundo TAIZ e ZEIGER (2008) a aplicação de citocininas pode inibir o processo de alongamento de raízes.

A massa fresca dos brotos não foi influenciada pela adição dos reguladores

de crescimento, apresentando valor médio de 0,08 g (Quadro 3), entretanto a porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) aumentou com a utilização de BAP até a concentração de 2,9 mg L⁻¹ enquanto que a porcentagem de massa fresca de raízes (%MFR) decresceu até a mesma concentração (Figura 8).

O aumento na %MFPA dos brotos na presença de BAP provavelmente está relacionado ao maior número de brotos produzidos, com o aumento da concentração de BAP, refletindo um maior acúmulo de biomassa. Por outro lado, os baixos valores de %MFR observados na presença de BAP, provavelmente estão relacionados ao efeito negativo do BAP sobre o desenvolvimento do sistema radicular reduzindo, dessa forma, seu o acúmulo de biomassa neste compartimento.

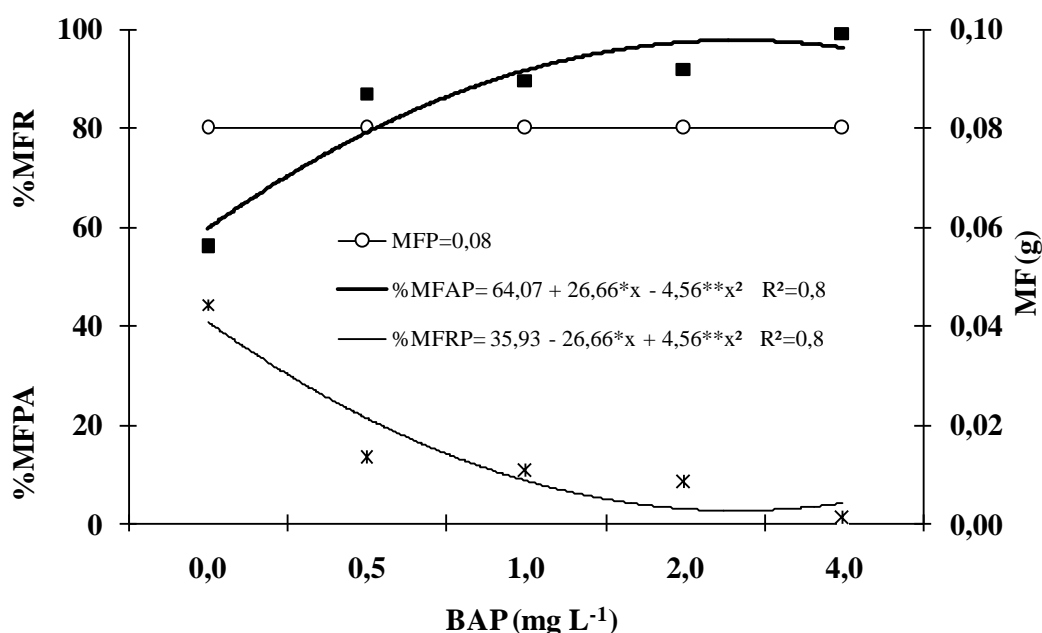


FIGURA 8. Massa fresca (MF), porcentagem de massa fresca da parte aérea (%MFPA) e das raízes (%MFR) de brotos de *Cattleya nobilior* Rchb.f. observados em função das concentrações de BAP. UFGD, Dourados – MS, 2013.

4 - CONCLUSÕES

O cultivo de *Cattleya nobilior* em meio MS por quatro meses, na ausência de reguladores de crescimento, proporcionou produção média de 19 brotos por planta e 0,8 raízes por broto, bem como resultou na formação de brotos com comprimento médio de 1,9 cm e massa fresca de 0,08g.

A adição de BAP favoreceu a porcentagem de massa fresca da parte aérea e a sobrevivência das plantas. Por outro lado, a adição de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA favoreceu a produção de folhas e o aumento na concentração deste regulador resultou em aumento no comprimento da maior raiz dos brotos de *C. nobilior*.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.61-67, 2006.

BASKER, S.; BAI, V. N. Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D.Don) Schtr. via pseudobulb segment cultures. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v.6, p.31-35, 2006.

BHADRA, S. K.; HOSSAIN, M. M. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. **Plant tissue culture**, v.13, n.2, p.167-171, 2003. Disponível em: < <http://www.baptcb.org/ptc/abstracts.asp?YEAR=247> > Acesso em: 25 jan. 2013.

BIANCHETTI, L. B. *Cattleya nobilior* Rchb.f. **Heringeriana**, Brasília, v.1, n.1, p.9-10, 2007.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A (Org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, p.227-254, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; PEREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:EMBRAPA/CNPH, 1998. v.1, p.87-132

COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p.351-370.

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

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124p.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3**. Universidade Federal de Lavras. 2010.

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

KRAPIEC, P. V.; MILANEZE, M. A.; MACHADO, M. F. P. S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v.25, n.1, p.179-182, 2003.

KUMARI, P. I.; GEORGE, S. T.; RAJMOHAN, K. Influence of plant growth regulators on *in vitro* clonal propagation of *Dendrobium* Sonia 'Earsakul'. **Journal of Bio Innovation**, v. 2, n.2, p.51-58, 2013. Disponível em : < http://www.jbino.com/docs/Issue02_03_2013.pdf >. Acesso em: 25 jan. 2013.

KUMARIA, S.; TANDON, P. Orchids: the World's most wondrous plants. In: PATHAK, P.; SEHGAL, R. N.; SHEKHAR, N.; SHARMA, M.; SOOD, A. **Orchids: science and commerce**. 1.ed. India, Bishen Singh Mahendra Pal Sing, 2001, p.17-28.

MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulator I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J (Orgs.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. v. 01. Dordrecht: Springer, 2008. p.175-204.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, BRASIL. Instrução normativa n. 6 de 23 de setembro de 2008. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>. > Acesso: 14 jan. 2013.

MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; MOK, D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.36, p.102-107, 2000. Disponível em: < <http://hos.ufl.edu/sites/default/files/courses/hos6373c/february%205/cytokinins.pdf> >. Acesso em: 24 jan. 2013.

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

NAGARAJU, V.; MANI, S. K. Rapid *in vitro* propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.14, p.27-32, 2005.

PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R.; MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.551-555, 1999. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/PeresJPPP1.PDF> >. Acesso em: 14 jan. 2013.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320p.

SCARPELLA, E.; BARKOULAS, M.; TSIANTIS, M. Control of leaf and vein development by auxin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, p.1-17, 2010.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.1, p.25-33, 2001.

STADEN, J.; ZAZIMALOYA, E.; GEORGE, E.F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK,

G-J (Orgs.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. Ed. V. 01. Dordrecht: Springer, 2008. p.205-226.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.147-158, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819p.

WOTAVOVÁ-NOVOTNÁ, K.; VEJSADOVÁ, H.; KINDLMANNI, P. Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. **Biologia Plantarum**, v.51, n.1, p.198-200, 2007.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 101-118, 2003.