

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA
Brassavola flagellaris x *Cattleya harrisoniana***

MÁRCIO GIL DE ANDRADE NASCIMENTO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2007**

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA
Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana

MÁRCIO GIL DE ANDRADE NASCIMENTO

Engenheiro Agrônomo
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2004

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

N 244

Nascimento, Márcio Gil de Andrade

Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana* / Márcio Gil de Andrade Nascimento - Cruz das Almas, BA, 2007.

42 f.: il., tab.

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007.

1. Orquídeas 2. Regulador vegetal 3. Organogênese *in vitro*
I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas II. Título.

CDD 20. ed. 584.15

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

Dr^a. Janay Almeida dos Santos Serejo
EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado de Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em

Aos meus pais Gilberto e Geny, pelo amor, compreensão, exemplo de vida, confiança e incentivo. É pra vocês que **DEDICO** com amor este trabalho.

Às minhas irmãs Daniella, Dolores Rachel e Maria da Glória que tanto admiro e amo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me iluminado e agraciado com essa vitória.

Aos meus pais Geny e Gilberto, por todo o amor dedicado, a confiança e a busca por aprendizado que eles tanto lutaram para me dar.

As minhas irmãs Daniella, Dolores Rachel e Maria da Glória pelo companheirismo, confiança, amor e carinho.

Ao Prof. orientador Weliton Antonio Bastos de Almeida pela orientação, amizade, aprendizado e compreensão em todos os momentos.

A Prof^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa pela atenção e apoio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A UFRB por ter me dado essa oportunidade única.

A todos meus familiares, tios, primos, avós, por toda confiança, carinho e amizade.

Aos colegas de mestrado pela amizade e companheirismo. Em especial à Candice Ferreira de Brito minha mais nova irmã, por tudo que passamos durante o curso e por tudo que fez e faz.

A Bibliotecária Sr^a. Isaelce Santos Silva pela ajuda nas correções.

Aos funcionários do mestrado Sidinha e Til pelo apoio e disposição em ajudar.

Ao funcionário Sr. Crispim pela ajuda no laboratório.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFRB (Elma, Nero e Fabíola) pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos amigos da República Uesquiana Arnaldo, Franklím, Edivânia, Augusto, Tâmara, Zuzinaide, Luana e Maria Alice que tanto me aturaram.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
ORGANOGENESE <i>IN VITRO</i> DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA <i>Brassavola flagellaris</i> x <i>Cattleya harrisoniana</i>	12
Capítulo 2	
DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MICROPLANTAS DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA <i>Brassavola flagellaris</i> x <i>Cattleya harrisoniana</i>	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
ANEXO	

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*

Autor: Márcio Gil de Andrade Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*. Para a organogênese *in vitro* foram realizados três experimentos avaliando segmentos mediais foliares em condições de escuro seguido de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $22 \text{ mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, segmentos apicais e basais foliares e segmentos internodais em fotoperíodo de 16 horas. Todos esses experimentos foram introduzidos em cinco concentrações de BAP em meio de cultura MT. No desenvolvimento das microplantas foram utilizadas brotações obtidas da organogênese, onde se testou em meio de cultura MT três concentrações de GA_3 , dois tipos de vedação e duas condições de luminosidade. Para o enraizamento as brotações desenvolvidas foram incubadas em meio MT com três concentrações de ANA. Na organogênese verificou-se que os segmentos mediais foliares não responderam morfogeneticamente; já os apicais e basais apresentaram resultados nas concentrações de $2,0$ e $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, respectivamente. Os segmentos internodais apresentaram responsividade de 92% e número médio de brotos por explante de 2,38 na concentração de $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP. O melhor desenvolvimento das brotações ocorreu na concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 em condições de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $22 \text{ mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com vedação de PVC. Todas as brotações enraizaram não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Palavras-chave: Orquidaceae, Regulador vegetal, Organogênese *in vitro*, desenvolvimento.

**IN VITRO MORPHOGENESIS OF THE ORCHID HIBRID *Brassavola flagellaris*
x *Cattleya harrisoniana***

Author: Márcio Gil de Andrade Nascimento

Adviser: Prof. Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

ABSTRACT: The objective of this work was to develop a protocol for morphogenesis *in vitro* of the hybrid of orchid *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*. For organogenic *in vitro* had been carried through three experiments evaluating leaf medial segments in conditions of dark followed of photoperiod of 16 hours and density of flow of fótons of $22 \text{ mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apical segments and basal leaf and internodal segments in photoperiod of 16 hours. All these experiments had been introduced in five concentrations of BAP in way of culture MT. In the development of the microplants sprouts gotten of organogenic, had been used, where if it tested in the half MT three concentrations of GA_3 , two types of prohibition and two introduced conditions of luminosity. For the rooting the developed sprouts had been placed in the half MT with three concentrations of ANA. In organogenic it was verified that the leaf medial segments had not answered morphogenetic; already the basal apical and had presented resulted in the 3,0 concentrations of 2,0 and mgL^{-1} of BAP, respectively. The internodal segments had presented responsive of 92% and average number of sprouts for explant of 2,38 in concentration of $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ of BAP. Optimum development of the sprouts occurred in the concentration of $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ of GA_3 in conditions of photoperiod of 16 hours and density of flow of fotons of $22 \text{ mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, with prohibition of PVC. All the sprouts had taken root not having significant difference between the treatments.

Key words: Orchidaceae, Growth regulator, *in vitro* organogenic, development.

INTRODUÇÃO

O cultivo mundial de flores e plantas ornamentais alcança a fabulosa cifra de US\$ 90 bilhões por ano, conforme cálculos atribuídos pelo Conselho de Floricultura da Holanda, país que domina 53% do mercado internacional de floricultura. Já as vendas globais entre os outros países, tais como Japão, França, Espanha movimentariam US\$ 6,7 bilhões/ano, do qual as exportações brasileiras de US\$ 12,4 milhões/ano representam apenas 0,2% (média dos últimos cinco anos). Porém apesar de ser uma atividade recente e até o final da década de 50 pouco expressiva, tanto econômica como tecnologicamente, a produção brasileira vem se desenvolvendo rapidamente com o surgimento e adoção de novas tecnologias, tanto nos sistemas de produção como de pós-colheita (LAMAS, 2002). Além disso, as condições de produção do nosso país, dotado de diversidade de solo e clima, permitem o cultivo de grande número de espécies de flores e plantas ornamentais de comprovada qualidade e beleza, conferindo ao produto brasileiro condições de abrir espaço e se firmar também no mercado mundial (GRAZIANO, 2003).

A floricultura brasileira vem crescendo cerca de 20% ao ano e o seu comércio era praticamente restrito ao estado de São Paulo, que é responsável por cerca de 70% da produção. Atualmente há importantes núcleos de produção de flores e plantas ornamentais no Brasil, formados principalmente em regiões onde existem colônias de imigrantes japoneses e europeus, que trouxeram de seus países de origem espécies e algumas técnicas de produção, como é o caso de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco (GRAZIANO, 2001).

Atualmente existem no Brasil cerca de 5.260 ha de área com o cultivo de flores e plantas ornamentais. A maior parte (60%) é destinada à produção de

flores, e os outros 40% são destinados a plantas ornamentais. Aproximadamente 1.300 ha do cultivo de flores se realizam em ambiente protegido (em estufas). A atividade está presente em mais de 3.500 propriedades rurais e proporciona mais de 26.000 empregos diretos no campo, em todo o país (AKI & PEROSA, 2002).

Orquídeas

As orquídeas ocorrem em quase todas as regiões da Terra, com exceção dos pólos e desertos, sendo mais freqüentes e exuberantes nos trópicos, entre os quais se localiza o Brasil, portador de um invejável banco de germoplasma dessas plantas, tornando-se também responsável pela sua preservação (SILVA, 2003).

A família Orquidaceae, é subdividida em mais de 500 gêneros e cada gênero possui de uma a centenas de espécies. O número total de espécies oscila em torno de 35.000 espalhadas pelo mundo inteiro. O gênero *Isabelia*, por exemplo, possui uma única espécie. O gênero *Cattleya* possui cerca de 70 espécies. E o gênero *Bulbophyllum* tem mais de mil espécies (SILVA, 1986). No Brasil, já foram descritas 2.350 espécies (MENEZES, 1987). Constituem uma família de plantas muito evoluídas, mas são relativamente rústicas, podendo ser cultivadas sem muita dificuldade. Baseados nos hábitos e *habitat* naturais das orquídeas é que devemos orientar o cultivo, procurando reproduzir o ambiente onde elas vivem. Muitas espécies desapareceram sem serem descritas e haverá certamente inúmeras outras a serem descobertas (BLACK, 1973).

O cultivo comercial de orquídeas vem apresentando significativo aumento nos últimos anos. Alguns gêneros com elevado valor econômico, como *Cattleya* e *Laelia*, são apreciados nos mercados brasileiro e internacional, evidenciando a potencialidade do País. As orquídeas são plantas herbáceas perenes, bastante diversificadas quanto ao tamanho, forma e cor das flores, sendo comercialmente cultivadas tanto para produção de plantas de corte como de vaso (KAMPF, 2000).

As orquídeas vegetam nos mais diversos ambientes, desde regiões frias a quentes; secas a muito úmidas e elevadas até as mais baixas altitudes (TOSCANO & MORAES, 2002). De acordo com o lugar de origem, as orquídeas são classificadas como: Epífitas – são a maior parte das orquídeas. Vivem grudadas em troncos de árvores, mas não são parasitas, pois realizam

fotossíntese a partir de nutrientes absorvidos pelo ar e pela chuva; Terrestres – são as que vivem como plantas comuns na terra. Sua porcentagem é pequena em relação às epífitas; Rupícolas – são as que vivem sobre rochas, fixadas nos líquens e folhagens decompostas acumuladas nas fendas e partes rebaixadas da pedra; Humícolas – são plantas que vivem no húmus das matas, ou seja, no material orgânico em decomposição existente sobre o solo das matas; Subterrâneas - Um caso extremo de adaptação, ocorrendo no subsolo. São as raras orquídeas subterrâneas que vivem na Austrália (ENDSFELDZ, 1997).

As orquídeas terrestres, na maior parte, apresentam raízes espessas e carnudas, a que se ligam raízes finas e fibrosas, como na maioria das plantas terrestres. Estas raízes buscam os nutrientes de que a planta necessita. As espécies epífitas têm geralmente raízes aéreas, além de um sistema radicular na base. Em natureza, estas raízes aéreas permitem que as plantas trepem ou rastejem ao longo dos seus vários suportes (MORALES et al., 2002).

A maioria das orquídeas apresenta um tecido esbranquiçado e esponjoso revestindo suas raízes. Denominado velame, este tecido é responsável pela rápida absorção de água e nutrientes, permitindo que muitas espécies de orquídeas vivam em locais praticamente desprovidos de solo (BLOSSFELD, 1999).

As sementes das orquídeas estão entre as menores do reino vegetal. O tamanho reduzido e a leveza facilitam a dispersão pelo vento, em muitos casos a grandes distâncias. O número de sementes pode chegar a um milhão por fruto. Ao contrário das sementes das outras plantas, elas são desprovidas de tecidos nutritivos, endosperma e cotilédones, responsáveis pela energia utilizada na fase inicial da germinação. Na falta de tecido nutritivo, essa energia é fornecida por certos fungos que vivem em simbiose com as orquídeas (ARDITTI, 1992).

Muitas espécies possuem folhas modificadas, com pecíolo globoso, denominado pseudo-bulbo onde armazenam grande quantidade de água, além de nutrientes, que muitas vezes são responsáveis pela perenidade de espécies que passam por estresse hídrico prolongado, como é o caso da *Cattleya walqueriana* e da *C. nobile* onde poucas vezes se encontra indivíduos com mais de três folhas ativas, pois a cada ano reservas são drenadas das folhas anteriores para o processo de floração (GONZAGA & GONZAGA, 1996; OLIVEIRA & SAJO, 1999).

As flores são muito peculiares, constituídas de um cálice com três sépalas, geralmente coloridas, e uma corola com duas pétalas características e uma terceira modificada que recebe o nome de labelo, a qual tem por função atrair insetos polinizadores. O estigma e o gineceu estão agrupados em um único apêndice, chamado de coluna, por onde se desenvolve o tubo polínico para alcançar o ovário, localizado no pendão floral, logo abaixo do cálice. Quando ocorre a fertilização, o ovário se desenvolve para formar o fruto, que no caso das orquídeas é denominado de cápsula (CAMPOS, 1996).

O fruto é uma cápsula, que se abre quando seca para liberar sementes minúsculas e leves, cujo embrião não passa de um aglomerado de células. As espécies de *Vanilla* são as únicas com frutos carnosos e sementes grandes, os quais são usados para a obtenção de baunilha (ARDITTI & ERNEST, 1992).

A *Cattleya harrisoniana* é uma espécie brasileira, possui pseudobulbos finos, roliços e sulcados, portando duas folhas coriáceas e pontudas de cor verde-clara. Hastes florais com duas a cinco flores. Flor de dez centímetros de diâmetro de cor lilás intenso. Labelo trilobado com lóbulo frontal branco amarelado. São poucas as variedades conhecidas, com destaque para a alba e a estriada. Floresce em Dezembro/Janeiro. A *Brassavola flagellaris* é uma espécie brasileira com pseudobulbos agregados e pequenos, folhas teretes, produzem haste floral na porção mediana, bráctea tênue. Gostam de luminosidade intensa, locais arejados e com boa umidade relativa do ar. Esse híbrido foi desenvolvido com o intuito de se antecipar a floração, característica ímpar da *Brassavola* (SILVA,1986).

Cultivo *in vitro* de plantas

Apesar do muito que já foi realizado na cultura de tecidos vegetais, existem ainda desafios a serem superados com conhecimento e idéias engenhosas que possam efetivamente encontrar soluções para muitos problemas que ocorrem na agricultura (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

Mediante o emprego racional de suas técnicas, a cultura de tecidos pode tanto propiciar a produção comercial contínua de milhares de mudas de alta qualidade e com a fidelidade genética mantida, aspectos também fundamentais para a conservação *in vitro* de germoplasma, como gerar variabilidade, aspecto

importante também para o melhoramento genético (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). As ornamentais são, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação da micropropagação teve uma expressão significativa no mundo científico, com repercussão direta na economia. O incentivo para esse crescimento fundamenta-se no alto valor agregado ao produto final (CAPELLADES-QUERALT et al., 1993).

Segundo Barrueto Cid (2001), a necessidade de obtenção de plantas matrizes sadias torna a cultura de tecidos um método de propagação importante, além de possibilitar a obtenção de grande número de plantas em curto espaço de tempo, com alta qualidade genética, propagação de clones em qualquer época do ano e de espécies que dificilmente seriam propagadas por métodos convencionais, suprimindo, assim, a necessidade dos produtores de flores ou plantas ornamentais na aquisição de mudas com qualidade comprovada. A micropropagação de plantas ornamentais e sua utilização em âmbito comercial já são realidade em diversos países do mundo, destacando-se Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, o Brasil (FRÁGUAS et al., 1999).

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado sob condições assépticas e cultivados em meio nutritivo artificial (PERES, 2002). Esse processo baseia-se na totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula do organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (KERBAUY, 1998).

A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos a partir de outros pré-existentes, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese. Na morfogênese, através do processo de organogênese, tecidos vegetais se diferenciam em meristemas caulinares e/ou radiculares, originando caules ou raízes, respectivamente. Quando a formação de órgão é decorrente diretamente de tecido do explante, ou de pequena proliferação do mesmo, denomina-se organogênese direta. Quando ocorre a partir de células do calo, denomina-se organogênese indireta (GEORGE, 1996).

O processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de três grupos de fatores. O primeiro se refere ao fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento do vegetal; o segundo está relacionado com as características originadas durante a

ontogênese; e, por fim, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY,1998).

A morfogênese *in vitro* está associada a processos que irão determinar o sucesso da regeneração, como: Desdiferenciação celular – que é a perda da especialização e a reversão da célula diferenciada a um estado meristemático; Indução celular - é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a estímulo físico, químico ou biológico; Diferenciação celular - consiste em mudanças fisiológicas e morfológicas das células, tornando-as especializadas para uma função particular; Competência - a capacidade do explante de responder a estímulos específicos, sendo um estado transitório onde as células podem ser induzidas à determinação; Determinação - a canalização progressiva, em direção a uma rota específica, de modo que, por um processo ordenado e previsível, ocorra a formação de órgãos e a regeneração de plantas a partir de células e tecidos vegetais e; Habituação - a habilidade adquirida por uma população de células de crescer e se dividir independentemente do suprimento exógeno de substâncias regulatórias do crescimento (KERBAUY, 1998).

As orquídeas apresentam um desenvolvimento vegetativo lento, visto que a divisão de uma muda leva, no mínimo, dois anos, o que torna muito lenta e onerosa a multiplicação de grandes quantidades para comercialização de mudas. A multiplicação das orquídeas por sementes também é demorada e, dos 2,5 milhões de sementes produzidas em uma cápsula, somente 5% germinam (STANCATO & FARIA,1996).

Knudson (1922) citado por Fráguas et al. (2003), desenvolveu um método de cultura não-simbiótico, mostrando que as sementes de orquídea podem germinar em meio de cultura contendo apenas sacarose. Posteriormente ele aperfeiçoou este meio, sendo, atualmente, o mais utilizado comercialmente na germinação e desenvolvimento de orquídeas (ARDITTI & ERNEST, 1992). Entretanto, não há uma formulação padrão para o meio Knudson que possibilite maior sucesso na micropropagação de todas as espécies ou variedades.

O cultivo *in vitro* proporciona taxa de germinação de aproximadamente 100% das sementes, ao passo que a cultura de meristemas é utilizada para propagar plantas idênticas à planta-mãe e isentas de viroses, especialmente plantas de alto valor econômico (ARAÚJO, 2004).

As primeiras plantas de importância econômica clonadas *in vitro* em escala comercial foram as orquídeas (PRAKASH et al., 1996), através da utilização de ápices caulinares para obtenção de plantas livres de vírus (MOREL, 1960). Embora os explantes possam ser obtidos de diversas partes da planta matriz, as gemas axilares e ápices caulinares são os tipos de explantes mais utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas, por possibilitar a limpeza clonal, a conservação e o intercâmbio de germoplasma (LAKSHMANAN, 1995), além de manter estabilidade e identidade genotípicas (PIERIK, 1990).

Um dos maiores entraves no processo de micropropagação de orquídeas está relacionado ao tempo necessário para a produção de mudas a partir de espécies híbridas selecionadas e à utilização de meio de cultura adequado para cada espécie (PASQUAL et al., 1997).

A composição e concentração hormonal no meio são fatores determinantes da morfogênese na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Certos tecidos dependem totalmente da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam (BORGATTO & HAYASHI, 2002). Estes tecidos podem ser biossinteticamente capazes a partir do isolamento do explante e do estabelecimento da cultura primária, ou desenvolver a capacidade durante o período de cultura (CALDAS et al., 1990).

A necessidade de utilização de auxinas e/ou citocininas para a morfogênese *in vitro* de plantas tem sido bem documentada na literatura. Os estudos pioneiros de Skoog & Miller (1957) estabeleceram que uma alta relação citocinina:auxina (c/a) promove a proliferação de brotos e suprime o desenvolvimento de raízes (estádio II da micropropagação), enquanto que uma baixa relação citocinina:auxina favorece o desenvolvimento de raízes (estádio III da micropropagação). Concentrações iguais dessas substâncias, em geral, propiciam a produção de calo. A utilização de reguladores vegetais deve ser feita de forma bastante criteriosa, pois em determinados casos, em fases específicas do desenvolvimento estes podem estimular respostas indesejáveis.

A suplementação com citocininas é favorável, ou até necessária. Das citocininas comercialmente disponíveis, a benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta os melhores resultados. As concentrações podem variar em função da espécie e do tipo de explante. Existem diferenças entre as citocininas: a BAP induz a formação de grande número de brotações e alta taxa de

multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto cinetina (KIN) e 2ip causam apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS, et al. 1990).

O grupo de regulador vegetal usado com maior freqüência é o das auxinas, que são essenciais no processo de enraizamento, possivelmente por estimularem a síntese de etileno, favorecendo assim a emissão de raízes (NORBERTO et al., 2001). O AIA, ANA e o AIB são as auxinas mais utilizadas no meio (ZIMMERMAN, 1981), sendo adicionadas no meio de cultura normalmente em baixas concentrações (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

As giberelinas têm como principal efeito estimular o crescimento de órgãos já formados, mas podem inibir a iniciação de outros processos de formação de órgãos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). As giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas (TAIZ & ZEIGER, 1991).

O objetivo desta dissertação foi desenvolver um protocolo para morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*. Sendo dividida em dois capítulos:

Capítulo 1: Organogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*.

Capítulo 2: Desenvolvimento *in vitro* de microplantas do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*.

REFERÊNCIAS

AKI, A.; PEROSA, J. M. Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n. 1/2, p. 13-23, 2002.

ARAUJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 898p.

ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York, John Wiley & Sons, 1992. 682p

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p. 16-21, mar./abr. 2001.

BLACK, P. Mck. **Orquídeas**. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Rio de Janeiro: Livro Técnico, 1973. 128p.

BLOSSFELD, A. **Orquidologia, orquidofilia e orquicultura**. Rio Claro: Funep, 1999. 89p.

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

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In.: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 171-200.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: manual prático da cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 1996. 143p.

CAPELLADES-QUERALT, M. et al. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation technology and application**. London: Kluwer Academic, 1993. p. 215-229.

ENDSFELDZ, W. F. Como identificar orquídeas. Editora Europa, **Revista Natureza**, ed. 3a (Edição especial Orquídeas), 72 p., 1997

FRÁGUAS, C. B. et al. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. Lavras: Editora UFLA, 1999. (Boletim técnico).

FRÁGUAS, C. B. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Lavras, v.50, n. 292, p. 719-726, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: The Technology. Wilts: Exegetics, 1996. Part. 1, 575-1333.

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

GONZAGA, M. E. B.; GONZAGA, A. L. A estrutura das orquídeas. **Boletim Catarinense de Orquídeas e Bromélias**. v. 4, n.5, p. 2-3. 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA: CBAB/EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRAZIANO, T. T. FloraBrasilis finaliza o diagnóstico do setor produtivo. **Informativo Ibraflor**, Campinas, v. 7, n. 25, p. 3-4, maio 2001.

GRAZIANO, T. T. Melhoramento de plantas ornamentais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Mesa redonda...** Porto Seguro: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1 CD-ROM.

KAMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Porto Alegre: Agropecuária. 2000.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1998. p. 519-531.

LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 86p. (Série Empreendedor,5).

LAKSHMANAN, P.; LOH, C. S.; GOH, C. J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using thin section culture. **Plant Cell Reporters**, n.14, p. 510-4, 1995.

MOREL, G. M. Producing vírus-free *Cymbidium*. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495-497, 1960.

MENEZES, L.C. ***Cattleya labiata* Lindley: orquídeas brasileiras**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1987. 112p.

MORALES, S. et al. Anatomia das raízes de sessenta e cinco espécies de orquídeas nativas do Brasil. **Arquivos da APADEC**, Maringá, v. 6 (supl.), n. 2, p. 116, 2002.

NORBERTO, P. M. et al. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.533-541, maio/jun., 2001.

OLIVEIRA, C. V.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999.

PASQUAL, M. et al. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras - MG: UFLA/FAEPE, 1997. 127p.

PERES, L.E.P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PRAKASH, L.; LEE, C. L.; GOH, C. J. *In vitro* propagation of comercial orchids: an assessment of current methodologies and development of a novel approach – Thin section culture. **Journal of Orchid Societ India**, v.10, n.1-2, p. 31-41, 1996.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitotcnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1986.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. In: **Symposium of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

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

TOSCANO, L. A. de B.; MORAES, M. M. de. 2002. Saiba mais sobre orquídeas. 2002. Disponível em: < <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>>. Acesso em 04 dez. 2006.

ZIMMERMANN, R. H.; BROOME, O. C. Phoroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 5, p. 648-652, sept. 1981.

CAPÍTULO 1

ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia

ORGANOGENESE *IN VITRO* DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de multiplicação e responsividade dos diferentes explantes não meristemáticos à diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*. Para fonte de explantes foram utilizadas plantas germinadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em placas de petri contendo meio de cultura MT, acrescidos de 25 gL⁻¹ de sacarose, solidificado com agar (0,8%) e suplementado com concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mgL⁻¹). O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 127 °C durante 20 minutos, em seguida foram levados para câmara de crescimento a 27 ± 2 °C. Para a indução da organogênese *in vitro* foram realizados três experimentos: No primeiro utilizou-se segmentos mediais de folhas em condições de escuro seguido de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹. No segundo foram utilizados segmentos basais e apicais de folhas em condições de escuro seguido de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹. Por fim, segmentos internodais em condições de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹. Os segmentos mediais de folhas não responderam. Segmentos basais e apicais mostraram respostas organogênicas, porém com pouca responsividade. Já os segmentos internodais apresentaram boas respostas. A maior responsividade (92%) e número de brotos por explante (2,38), ocorreram na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP, contudo os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Orquidaceae, Gemas adventícias.

**IN VITRO ORGANOGENESIS HIBRID ORCHID *Brassavola flagellaris* x
*Cattleya harrisoniana***

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the tax of multiplication and responsive of the different not meristematics explants to the different concentrations of BAP and conditions of luminosity of the hybrid of orchid *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*. For source of explants *in vitro* had been used germinated plants. The explants had been cultivated in plates of petri contend half of culture MT, increased of 25 gL⁻¹ of sucrose, made solid with agar (0.8%) and supplemented with concentrations of BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mgL⁻¹). The pH was adjusted in 5,8 before the autoclaving the 127 °C during 20 minutes, after that had been taken for growth chamber the 27 ± 2 °C. For the induction of organogenic *in vitro* had been carried through three experiments: In the first one used medial leaf segments in conditions of dark followed of photoperiod of 16 hours and density of flow of fotons of 22 mE.m⁻².s⁻¹. In as basal and apical segments of leves in conditions of dark had been used followed of photoperiod of 16 hours and density of flow of fotons of 22 mE.m⁻².s⁻¹. Finally, internodal segments in conditions of photoperiod of 16 hours and density of flow of fotons of 22 mE.m⁻².s⁻¹. The medial leaf segments had not answered. Basal and apical segments, they had shown to answers organogenics, however with little responsive. Already the internodal segments had presented good answers. The biggest responsive (92%) and number of sprouts for explant (2,38) occurred in the concentration of 4,0 mg L⁻¹ of BAP , however the treatments do not differ statistical between itself.

Key-words: *in vitro* culture, Orchidaceae, adventitious buds

INTRODUÇÃO

As orquídeas podem ser propagadas tanto pela via seminífera como pela vegetativa. A grande maioria das espécies é de fecundação cruzada e pode, portanto, apresentar alta heterogeneidade. Além disso, algumas delas não aceitam a autofecundação artificial por causa da auto-incompatibilidade ou de outros fatores. Entretanto, com independência destes fatos, o processo de propagação pela via seminífera, vai propiciando elevada taxa de segregação gênica à medida que novas variedades, espécies ou gêneros vão sendo acrescentados aos cruzamentos, resultando numa população descendente genotipicamente e fenotipicamente distinta da planta-matriz. Portanto, o método seminífero constitui-se uma estratégia, em geral, contra-indicada para a multiplicação de determinados híbridos. Este método é útil para a obtenção das progênes a partir das sementes obtidas nos trabalhos de melhoramento genético (Arditti & Ernst, 1992).

Uma das possíveis causas nas diferenças de resultados obtidos para variáveis como a capacidade de regeneração e multiplicação das espécies *in vitro* pode ser explicada pelo tipo de explante utilizado e, de acordo com Pierik (1990), são comuns os efeitos da posição e idade dos explantes sobre o processo da regeneração e multiplicação. Desta forma, a homogeneidade dos explantes no momento inicial do cultivo é de fundamental importância na precisão da estimativa de multiplicação (Pereira et al., 2005).

A maior parte dos experimentos de micropropagação de orquídeas utilizam o meristema apical ou o ápice caulinar da planta mãe ou dos novos brotos. A utilização de outros explantes surgiu no intuito de diversificar as opções, tendo em vista que o número de meristemas apicais em cada planta é limitado. Desta forma, outros tipos de explantes surgem como alternativas para superar essas limitações (Fráguas et al., 1999).

A adição de reguladores vegetais no meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que são isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou multiplicação da parte aérea. Tombolato & Costa (1998) mostraram que as dificuldades de desenvolvimento de um protocolo adequado para cada espécie

vegetal está relacionada com as fontes de explantes vegetais e os meios nutritivos.

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (Santiago et al., 2001). Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. O tipo e a sua concentração são fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Dentre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies. Alguns dados sugerem que essa citocinina parece ser, por excelência, a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (Hu & Wang, 1983; Grattapaglia & Machado, 1998).

O híbrido de *B. flagellaris* x *C. harrisoniana* possui beleza extraordinária e tem ótima aceitação comercial. Esse híbrido possui uma floração antecipada e necessita de menos luminosidade que o gênero *Brassavola*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de multiplicação e responsividade de diferentes explantes não meristemáticos a diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Para fonte de explantes foram utilizadas plantas do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana* germinadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), acrescidos de 25 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com agar (0,8%) e suplementado com concentrações de BAP. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 127 °C durante 20 minutos. Com o intuito de induzir a organogênese *in vitro* foram realizados os seguintes experimentos:

1. Efeito de concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de brotos a partir de segmentos foliares

Segmentos foliares mediais foram seccionados com ± 1 cm de comprimento descartando-se as extremidades basais e apicais, e introduzidos no meio MT com a face abaxial em contato com o meio de cultura. O meio foi suplementado com cinco concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg L⁻¹). As placas foram levadas para a câmara de crescimento sob condições de temperatura de 27 ± 2 °C, densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas; e diretamente no escuro por 30 dias, seguidos de fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 2, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 10 segmentos.

2. Efeito da polaridade dos segmentos foliares basais e apicais em diferentes concentrações de BAP na indução de brotos

As folhas foram divididas em duas partes (basal e apical) e cultivadas separadamente em meio MT com a face abaxial em contato com o meio de cultura. O meio foi suplementado com cinco concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg L⁻¹). As placas foram colocadas sob condições de temperatura de 27 ± 2 °C em ausência de luminosidade por 30 dias, seguida de fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 2, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 10 segmentos.

3. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos internodais em função de concentrações de BAP

Segmentos internodais com ± 1 cm de comprimento foram introduzidos em meio MT suplementado com BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg L⁻¹) e cultivados em câmara de crescimento sob condições de temperatura de 27 ± 2 °C, densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹ e com fotoperíodo de 16 horas durante 60 dias. O

delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 10 segmentos.

Análises estatísticas

As variáveis analisadas foram submetidas a análise de variância. Os dados foram analisados no programa SISVAR - Sistema de análises de variância para dados balanceados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de brotos a partir de segmentos foliares

Segmentos mediais de folhas jovens não demonstraram boa capacidade morfogênica. Os explantes levados diretamente para a luz permaneceram verdes por 15 dias e em seguida começaram a necrosar, chegando aos 60 dias completamente necrosados em todos os tratamentos (Figura 1a). Resultado similar foi encontrado por Caramaschi (2001) trabalhando com explantes foliares de *Cyrtopodium vernum* testando efeito de citocinina na regeneração *in vitro*. Porém, alguns autores conseguiram resultados satisfatórios com explantes foliares de orquídea *Phalaenopsis* (Tanaka & Sakanishi, 1977), *Miltonia* (Churchill et al., 1973) e *Vanda* (Teo et al., 1973).

A necrose foi retardada nos segmentos que ficaram 30 dias no escuro e depois foram levados para fotoperíodo de 16 horas. Os segmentos ficaram verdes por 60 dias (Figura 1b). Todos os segmentos ficaram completamente necrosados aos 120 dias (Figura 1c). Esse maior período para oxidação foi devido possivelmente, à síntese mais lenta de compostos oxidantes no escuro. Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudatos que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes (Santos et al., 2001).

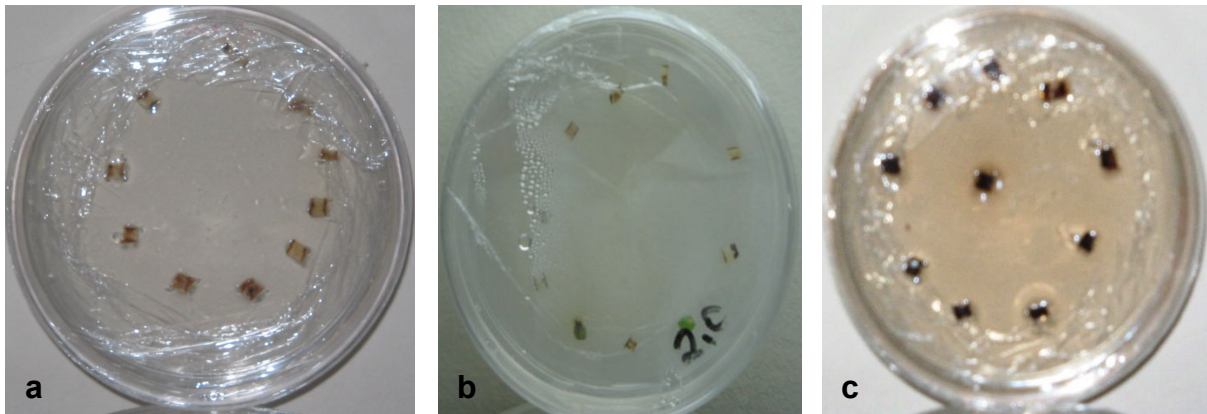


Figura 1: Efeito do BAP em segmentos foliares mediais do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*. a) segmentos foliares levados diretamente para fotoperíodo de 16 horas, completamente necrosados aos 60 dias; b) segmentos foliares que permaneceram 30 dias no escuro; c) segmentos foliares que permaneceram 30 dias no escuro, completamente necrosados após 120 dias.

Guedes & Pereira (2005) trabalhando com segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de pimenta longa testando BAP ou KIN, não conseguiram resposta organogênica e verificaram que os segmentos obtiveram altas taxas de oxidação. Na regeneração *in vitro* de *Bambusa gracilis* (Zaffari et al., 2005) e Pereira (Erig & Schuch, 2003) a partir de segmentos foliares, não obteve-se sucesso na resposta organogênica.

Almeida (2002) não obteve sucesso na organogênese *in vitro* a partir de segmentos de folha adulta de laranja 'Natal', 'Valência' e 'Pêra'. Contudo, conseguiu o desenvolvimento de gemas adventícias em laranja 'Hamlin', porém em baixos números.

Efeito da polaridade dos segmentos foliares basais e apicais em diferentes concentrações de BAP na indução de brotos

Houve resposta morfogênica em relação ao tipo de segmento da folha. Após 60 dias de cultivo os segmentos não demonstraram alteração na cor, tendo os tratamentos de 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP seus explantes intumescidos em ambas as polaridades. Aos 120 dias, obteve-se resposta dos explantes de 10% e 6% no surgimento de brotos na polaridade basal e apical, respectivamente, nas referidas concentrações de BAP (Figura 2). Todos os outros segmentos estavam

completamente oxidados aos 120 dias. Esses baixos índices de regeneração podem ser causados por fatores como o genótipo, meio de cultura, reguladores de crescimento entre outros. Não foram encontrados trabalhos dessa natureza com orquídeas na revisão de literatura, sendo assim há a necessidade de novos estudos para se obter uma regeneração mais eficaz desse tipo de explante, já que ele demonstrou capacidade morfogénica.

Em vários trabalhos têm se mostrado a influência da polaridade de explantes nas respostas à regeneração de plantas. Barbosa et al. (1990) estudando diferentes concentrações de BAP visando obter melhor taxa na proliferação *in vitro* de macieira 'Gala' verificaram que a presença de BAP promove intensa brotação na parte basal dos explantes quando se utiliza 1 mgL^{-1} .

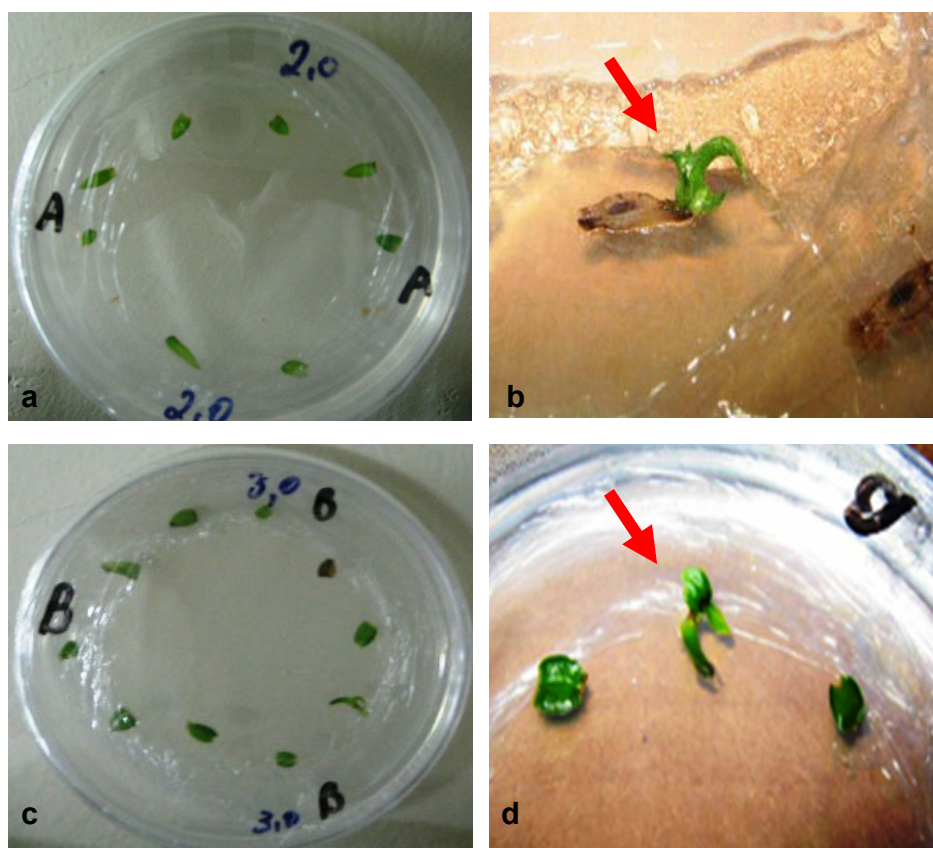


Figura 2: Organogênese a partir de segmentos foliares basais e apicais do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*. a) segmentos apicais; b) brotação adventícia a partir de segmento apical; c) segmentos basais; d) brotação adventícia a partir de segmento basal.

Silva et al. (2005a,b) estudando a organogênese *in vitro* de laranja 'Pêra' e tangerina 'Cleópatra', respectivamente, verificaram que os segmentos de epicótilo mediais e apicais mostram-se mais eficazes na resposta organogenética *in vitro*, quando comparados com os segmentos basais. Entretanto, com laranja, a melhor resposta foi obtida utilizando BAP na concentração de $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ para a tangerina.

Na macieira, avaliando a multiplicação influenciada pelo tipo de explante, Pereira & Fortes (2001), introduziram segmentos basais e apicais de folhas de duas variedades de maçã em meio de cultura MS suplementado com $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e observaram que a formação de brotações em maior número e tamanho ocorre quando se utiliza segmentos basais para a cultivar 'Marubakaido' e maior formação de gemas nos explantes da cultivar 'M.111'.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Grattapaglia & Machado (1998) de que são comuns os efeitos da posição dos explantes sobre a multiplicação *in vitro*. E que a resposta morfogênica é variável de acordo com o genótipo da planta, e que essa variação ocorre até mesmo entre cultivares de uma mesma espécie.

Organogênese *in vitro* em segmentos internodais em função de concentrações de BAP

Os segmentos internodais promoveram o surgimento de brotações adventícias em todos os tratamentos (Figura 3). O maior número de explantes responsivos (92%) e número de brotos (2,38) ocorreu no tratamento com $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, porém nenhum dos tratamentos diferiu estatisticamente (Tabela 1). Apesar do número de brotos ter sido maior no tratamento com $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, o tratamento sem regulador de crescimento iniciou a emissão de brotações adventícias primeiramente e obteve um melhor crescimento das mesmas. Assim, para este híbrido de orquídea o nível endógeno de citocinina mostrou-se suficiente para a formação de brotações adventícias.

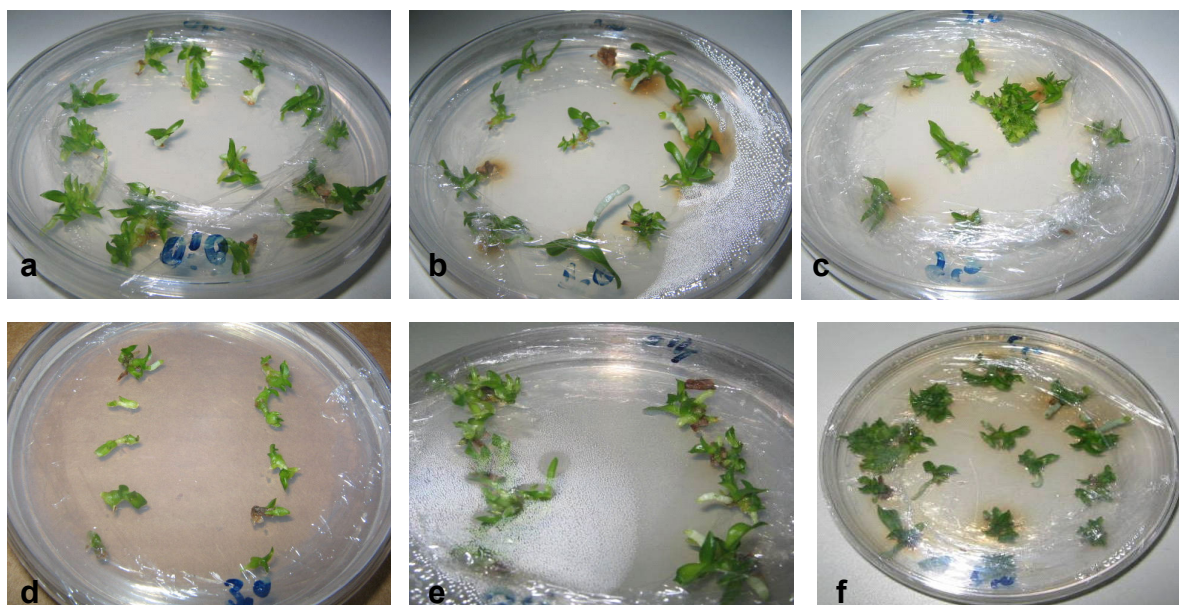


Figura 3: Brotações adventícias a partir de segmentos internodais do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana* em diferentes concentrações de BAP. a) Testemunha (sem regulador vegetal); b) Brotações obtidas com 1,0 mgL⁻¹ BAP; c) Brotações obtidas com 2,0 mgL⁻¹ BAP; d) Brotações obtidas com 3,0 mgL⁻¹ BAP; e) Brotações obtidas com 4,0 mgL⁻¹ BAP; f) Brotações obtidas com 5,0 mgL⁻¹ BAP.

Tabela 1. Explantes responsivos e número de brotos/explantes do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana* em função da concentração de BAP (mgL⁻¹).

Concentração de BAP (mgL ⁻¹)	Explantes Responsivos (%)	Nº brotos/explante
0,0	74a	1,65a
1,0	72a	1,98a
2,0	72a	2,02a
3,0	84a	2,04a
4,0	92a	2,38a
5,0	70a	1,65a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem significativamente no teste F a 5% de probabilidade.

Estes resultados concordam com os encontrados por Araújo (2004) que, trabalhando com híbridos de orquídea *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow' obteve maior número de brotos (3,4) utilizando meio MS combinado com 4,0 mgL⁻¹ de BAP, no entanto não houve diferença significativa pelo teste F entre os tratamentos. Silva (2003), trabalhando com a mesma espécie, porém com meio Knudson C também não verificou diferença significativa no uso do BAP.

Avaliando a organogênese *in vitro* de segmentos de epicótilo de laranja 'Pêra' introduzidos em meio de cultura MT e suplementado com concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mgL⁻¹), verificou-se que na ausência do regulador se obteve a maior percentagem de explantes responsivos, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos 1,0 e 2,0 mgL⁻¹ (Moura et al., 2001). O efeito do BAP na organogênese *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' foi prejudicial, já que foi observado que o maior percentual de explantes responsivos ocorreu na ausência de BAP em fotoperíodo de 16 horas e que com a adição do regulador reduzia a responsividade (Silva et al., 2005b).

Na micropropagação de gengibre utilizando como explantes gemas rizomatosas introduzidas em meio de cultura MS e combinações de BAP e/ou ANA, também verificou-se que o meio MS sem a adição de reguladores de crescimento proporcionou melhores resultados (Debiasi et al., 2004).

Neste trabalho, pode se verificar que na concentração de 5,0 mgL⁻¹ de BAP começou a ocorrer uma redução na resposta e provavelmente doses acima delas, irão continuar causando efeito inibitório. De acordo com Guevara (1987), existe uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória no desenvolvimento de brotos, acima da qual há um efeito inibitório, provavelmente devido à fitotoxidez causada pelo regulador vegetal. Isto já foi comprovado em alguns trabalhos por Biasi et al. (2000) com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Silva et al. (2005b) com *Citrus reshni* Hort. ex Tan., dentre outros. Provavelmente, altos índices exógenos de BAP, interagindo com o nível endógeno de citocinina, tenham dificultado a desdiferenciação, bem como a determinação celular, influenciando negativamente na proliferação de gemas adventícias.

O uso do BAP também apresentou efeito inibitório na multiplicação de calos e no potencial organogênico da orquídea *Gongora quinquenervis* (Martini, 2001).

Utilizando segmentos internodais na organogênese *in vitro* de maracujá amarelo variando concentrações de BAP, Biasi et al. (2000) verificaram que concentrações acima de 2,0 mgL⁻¹ de BAP eram prejudiciais ao desenvolvimento das gemas.

Em alguns trabalhos de organogênese tem se verificado que a concentração ótima tem variado dentre outros fatores com a espécie, cultivar e explante utilizado e, conhecendo essa concentração, tem se averiguado que doses superiores causam diminuição na resposta organogenética.

CONCLUSÕES

Segmentos foliares mediais não apresentaram resposta organogênica em diferentes concentrações de BAP.

Houve resposta organogenética nos segmentos foliares basais e apicais, porém com pouca expressividade.

Segmentos internodais são recomendáveis para a organogênese *in vitro* deste híbrido sem a adição do regulador de crescimento BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W. A. B. de **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* sp.** 2002. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARAUJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea.** 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2004.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. 682p.

BARBOSA, W. et al. Concentrações de 6 benzilaminopurina (BAP) na taxa de proliferação *in vitro* da macieira 'Gala'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.25, v.5, p. 747-751, 1990.

BIASI, L. A. et al. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 661-665, 2000.

CARAMASCHI, G. M. C. L. **Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* Spp. (Orquidaceae)** 2001. 110 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2001.

CHURCHILL, M.; BALL, E. A.; ARDITTI, J. Tissue culture of orchids-I methods for leaf tips. **The New Phytologist**, n. 72, p. 161-166, 1973.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 10, n. 1, p. 61-65, jan.-mar., 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pirus communis* L.) cultivar Carrik. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, maio/jun. 2003.

FRÁGUAS, C. B. et al. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. Lavras: Editora UFLA, 1999. (Boletim técnico).

GUEDES, R. da S.; PEREIRA, J. E. S. Fitorreguladores e fontes de explantes na organogênese *in vitro* de pimenta longa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Anais...Fortaleza**: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2005. 1 CD-ROM.

GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In: _____. **II Curso de cultivo de tejidos**. [S.l.]: Turrialba, 1987. p. 58-79.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A.,. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA: CBAB/EMBRAPA, 1998. v. 1, p.183-260.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A. (Ed.) **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

MARTINI, P. C. Propagação de *Gongora quinquenervis* via sementeira *in vitro* e organogênese indireta. **Revista ABCTP**, Recife, n. 40, p. 8, ago. 2001.

MOURA, T. L. de M. et al. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, ago., 2001.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p.417-420, ago. 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FRANCA, R. B.; DANTAS, A. C. de M. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p.86-89, jan./mar. 2005..

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Meios de cultura.. In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras, MG: UFLA, 2001. p. 22-35.

SANTOS, R. B.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F. Problemas no cultivo *in vitro*, In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras – MG: UFLA, 2001. p. 73-79

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotcniia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003.

SILVA, R. P. et al. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, Brasília, n. 12, v. 40, dez. 2005a.

SILVA, R. P. et al. Otimização de protocolos para regeneração *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. Ex. Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, dez. 2005b.

TANAKA, M.; SAKANISHI, Y. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. **American Orchid Society Bulletin** 1977. 46: 733-737.

TEO, C. K. H.; KUNISAKI, J. T.; SAGAWA, Y. Clonal propagation of strap-leafed *Vanda* by shoot tip culture. **American Orchid Society Bulletin** n. 42, p. 403-405, 1973.

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

ZAFFARI, G. R. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Bambusa gracilis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2005. 1 CD-ROM.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE MICROPLANTAS DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*²

² Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE MICROPLANTAS DO HÍBRIDO DE ORQUÍDEA *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e enraizamento *in vitro* do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*, testando diferentes concentrações de GA₃ e ANA, tipos de vedação do frasco e condições de luminosidade. Brotações com tamanho de ± 1 cm de comprimento foram excisadas em câmara de fluxo laminar e introduzidas em número de três em frascos contendo meio MT. Em seguida foram incubados em câmara de crescimento a 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹; e em ausência de luminosidade por 30 dias seguido de fotoperíodo de 16 horas. Foram testados dois tipos de vedação, duas condições de luminosidade e três concentrações de GA₃. O experimento foi montado em esquema fatorial 3 x 2 x 2, com sete repetições cada tratamento, e três brotos por repetição. Após 90 dias foram avaliados: comprimento das brotações (cm), número de folhas, tamanho da maior folha e peso da matéria seca. As brotações desenvolvidas foram inoculadas em meio MT contendo três concentrações de auxina ANA (0; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) para promoção do enraizamento e levadas para fotoperíodo de 16 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e 10 repetições, sendo que cada repetição era composta por quatro brotações. Após 60 dias foram avaliadas o percentual de enraizamento e o número de raízes. Não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas. O tratamento levado para o escuro oxidou e não pode ser avaliado. Para o número e percentual de enraizamento também não houve diferença significativa.

Palavras-chave: Orquidaceae, Enraizamento, Regulador vegetal.

IN VITRO DEVELOPMENT OF MICROPLANT THE ORCHID HYBRID

Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the *in vitro* development and rooting of the hybrid of orchid *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*, testing different concentrations of GA₃ and ANA, types of prohibition of the bottle and conditions of luminosity. Sprouts had been cut in chamber of laminar flow and introduced in number of three in increased bottles. After that, the bottles had been placed in growth chamber the 27 ± 2 °C, in photoperiod of 16 hours and density of flow of fotons of $22 \text{ mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; and in absence of luminosity for 30 days and followed after in one photoperiod of 16 hours. Two types of prohibition had been tested, two conditions of luminosity and three concentrations of GA₃. After 90 days had been evaluated: length of the sprouts (cm), leaf number, size of the biggest leaf and weight of the dry substance. The developed sprouts had been inoculated in the half MT contend auxin ANA (0; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) for promotion of the rooting. The used delineation was completely randomized, with three treatments and 10 repetitions, being that each repetition was composed for four sprouts. After 60 days had been evaluated the percentage of rooting and number it of roots. It did not have significant difference in none of the analyzed variable. The treatment taken for the dark one oxidated and it cannot be evaluated. For the number and percentage of rooting also it did not have significant difference.

Key-words: Orchidaceae, Rooting, Growth regulator.

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de valor comercial. Atualmente, muitas orquídeas encontram-se ameaçadas de extinção, e muitas já foram extintas sem mesmo serem estudadas, sendo portanto, importante o seu cultivo.

O desenvolvimento *in vitro* de orquídea é muitas vezes lento e demorado, necessitando de uma fase a mais no processo de regeneração, que é a fase de alongamento. Esta fase é utilizada quando as brotações obtidas não possuem condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu tamanho (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Serrano & Pinol Serra (1996), o cultivo de plantas em meio com giberelina induz o alongamento do caule conseqüentemente afetando assim o tamanho das plantas. Contudo, para cada cultura a interação genótipo x concentração de giberelina deve ser mensurada, assim como a resposta do tecido depende da utilização da giberelina apropriada para cada espécie e cada fase de desenvolvimento.

As tampas utilizadas para vedar os frascos, sabe-se que também exercem efeito no desenvolvimento de alguns explantes. Esse efeito é devido, principalmente, à formação de microclima dentro do frasco (Grattapaglia & Machado, 1998). As tampas de plástico (polipropileno) são as mais utilizadas nos laboratórios, porque são desenvolvidas especialmente para trabalhos em cultura de tecidos e resistem a elevadas temperaturas, podendo ser autoclavadas sem deformação. Porém, o elevado custo contribui para utilização de outros tipos de tampas, como: papel de alumínio, algodão, metal e vitafilme (PVC) (Pierik, 1987).

A formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas, no estágio de multiplicação, permite a constituição de plantas completas, para posterior transferência a condições *ex vitro* (Assis & Teixeira, 1998). Para isso, é utilizada a auxina, que aprimora a formação de raízes de brotos de plantas que, de outro modo, tem dificuldades de criar raízes. Embora existam espécies que formam raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, geralmente é necessário adicionar auxina exógena para estimular a rizogênese (Grattapaglia & Caldas, 1990). Tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que mais

influenciam no enraizamento, e a adição de outros biorreguladores é desnecessária ou até prejudicial (Grattapaglia & Machado, 1998). As mais utilizadas são o AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenoacético) e o AIA (ácido 3-indolacético), sendo o ANA o mais utilizado, parecendo ser o mais eficiente para o enraizamento *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e enraizamento *in vitro* do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*, testando diferentes concentrações de GA₃ e ANA, tipos de vedação do frasco e condições de luminosidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

As brotações utilizadas no experimento foram obtidas da multiplicação *in vitro* de orquídea a partir de segmentos internodais. Essas brotações foram excisadas em câmara de fluxo laminar e introduzidas em número de três em frascos contendo meio MT (Murashige & Tucker, 1969), acrescidos de 25 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH foi ajustado para 5,8 e autoclavado à 127 °C durante 20 minutos. Em seguida, os frascos foram incubados em câmara de crescimento a 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹; e em ausência de luminosidade por 30 dias seguido de fotoperíodo de 16 horas.

Os tratamentos testados foram: três concentrações de GA₃ (1,0; 2,0; 3,0 mg L⁻¹); dois tipos de vedação dos frascos (PVC e alumínio+PVC); e duas condições de luminosidade (30 dias no escuro seguido de fotoperíodo de 16 horas; e diretamente num fotoperíodo de 16 horas). O experimento foi montado em esquema fatorial 3 (concentrações GA₃) x 2 (tipos de vedação) x 2 (condições de luminosidade), perfazendo um total de 12 tratamentos, com sete repetições cada, e três brotos por repetição.

Após 90 dias foram avaliadas o comprimento das brotações (cm), número de folhas, tamanho da maior folha e peso da matéria seca. Para análise da matéria seca utilizou-se estufa de ventilação forçada à 70 °C até atingir massa

constante. As variáveis analisadas foram submetidas a análise de variância. Os dados foram analisados no programa SISVAR - Sistema de análises de variância para dados balanceados.

As brotações desenvolvidas foram inoculadas em meio MT, acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%), contendo auxina ANA para promoção do enraizamento. Foram utilizadas três concentrações (0; 1,0; 2,0 mg L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 e autoclavado à 127° C durante 20 minutos. Em seguida, os frascos foram incubados em câmara de crescimento a 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 mE.m⁻².s⁻¹. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e 10 repetições, sendo que cada repetição era composta por quatro brotações.

Após 60 dias foram avaliadas a percentagem de enraizamento e número de raízes. As variáveis foram submetidas a análise de variância. Os dados foram analisados no programa SISVAR - Sistema de análises de variância para dados balanceados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos colocados durante 30 dias no escuro para possível estiolamento, não conseguiram desenvolver, necrosando algumas brotações já na primeira semana. No final dos 30 dias todas as brotações se encontravam completamente necrosados (Figura 1a). Desta forma, não foi possível avaliar os tratamentos colocados no escuro.



Figura 1: Brotações do híbrido de orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*. a) Brotações que permaneceram no escuro por 30 dias; b) brotações desenvolvidas após 90 dias com $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 , vedação com PVC e mantidas diretamente em condições de luminosidade.

Não houve interação significativa entre as concentrações de GA_3 avaliadas e os tipos de vedação, para nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 1). Isoladamente também não houve diferença significativa. Sendo assim, a concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 e vedação somente com filme PVC é suficiente para o desenvolvimento *in vitro* deste híbrido de orquídea (Figura 1b).

Tabela 1: Valores médios para a altura de brotações, número de folhas, tamanho da maior folha e matéria seca das brotações de *B. flagellaris* x *C. harrisoniana*.

Concentração GA_3 (mgL^{-1})	Tipo de vedação	Altura de Brotações (cm)	Nº folhas	Tamanho maior folha (cm)	Materia seca (mg)
1,0	Alum. + PVC	2,53a	6,45a	1,77a	24,03a
1,0	PVC	2,63a	6,00a	1,46a	20,10a
2,0	Alum. + PVC	2,44a	6,11a	1,57a	21,41a
2,0	PVC	2,50a	7,00a	1,16a	21,39a
3,0	Alum. + PVC	2,24a	6,91a	1,41a	24,75a
3,0	PVC	2,33a	6,78a	1,51a	23,35a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem significativamente no teste F a 5% de probabilidade.

Analisando o desenvolvimento geral das brotações podemos verificar que a concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 , foi a que demonstrou melhores resultados. Nem todas as variáveis obtiveram melhores resultados na concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 , porém as brotações se desenvolveram melhor, tendo visualmente brotações mais vigorosas, além do que se torna economicamente mais viável, já que se utiliza uma concentração menor do regulador vegetal e uma única vedação. Isto pode ser devido a maioria das culturas possuírem níveis endógenos deste regulador capazes de promover o seu desenvolvimento (Grattapaglia & Machado, 1998). Corroborando com este resultado Costa et al. (2004), estudando o efeito de diferentes concentrações de GA_3 em jenipapeiro, verificaram que a concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ deste regulador promoveu o melhor crescimento das brotações.

O desenvolvimento *in vitro* das orquídeas é muito difícil. Analisando ensaios preliminares (dados não apresentados) podemos observar que não ocorre o desenvolvimento das brotações na ausência da giberelina, com isso não utilizamos tratamento testemunha (ausência de regulador), haja visto que as brotações não desenvolviam.

Poucas culturas *in vitro* mostram resposta às giberelinas. Porém, existem algumas exceções que mostram uma resposta nítida à presença desse regulador no meio (Caldas et al., 1998). Carvalho et al. (1999) estudando os efeitos do ácido giberélico e benzilaminopurina em plântulas de cafeeiro *in vitro*, verificou que os brotos se desenvolvem melhor com a adição de $6,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e $16,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 no meio MS. Silva et al. (2004), em ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia maritima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae, verificou que o meio MS com 100% dos sais e com $2,6 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido giberélico, é o mais eficiente para o alongamento de brotos dispostos em agrupamento.

Avaliando isoladamente o tipo de vedação, pode-se perceber que a vedação sem o papel alumínio, só não foi superior no tamanho da maior folha, isto pode ter ocorrido devido ao fato das folhas se alongarem em busca de luminosidade. Sendo assim, a vedação somente com o filme PVC melhorou o desenvolvimento das brotações. Utilizando esta película, o meio de cultura tende a perder água mais rapidamente do que num frasco vedado com tampas plásticas. Uma menor disponibilidade de água na fase gasosa do frasco pode

evitar necroses apicais por deficiência de elementos pouco translocáveis como o cálcio (Grattapaglia & Machado, 1998).

Todas as brotações enraizaram, mesmo aquelas sem regulador de crescimento, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. O maior número de raízes (3,82) foi verificado na concentração de 2,0 mgL⁻¹ de ANA, contudo não diferiu estatisticamente dos outros tratamentos. Ratificando esses resultados, Silva (2003) trabalhando com multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, verificou que na ausência do regulador ANA as brotações enraizavam, porém ele constatou que com o aumento das concentrações de ANA causavam efeito inibitório no número de raízes. Possivelmente, esse híbrido possua níveis endógenos de auxina suficientes para a promoção do enraizamento.

Fior et al. (2000) trabalhando com propagação *in vitro* de *Limonium latifolium* Kuntze (*Plumbaginaceae*), verificou que o acréscimo da auxina ANA ao meio de enraizamento não trouxe resultados superiores aqueles obtidos no tratamento sem regulador. Silva et al. (2005) trabalhando com regeneração *in vitro* de laranja 'Pêra' também verificou que na ausência de auxina obtêm-se os melhores resultados no enraizamento.

Peres et al. (1999), avaliando o efeito de ANA em orquídea, concluíram que a formação de raízes e brotos é mais favorecida pelo balanço interno de ácido indolacético/citocinina e efeito externo citocinina/etileno. O efeito às vezes inibitório e às vezes estimulante dos fitoreguladores na formação de brotos e raízes pode estar associado à absorção dos reguladores de crescimento pelo substrato (George, 1993), à habituação (Santana & Paiva, 2001) ou à deficiência de proteína ligante promotora da atuação das citocininas (Taiz & Zeiger, 1998).

Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam com níveis muito reduzidos de auxinas ou em meio básico sem substância de crescimento (Anderson, 1984). Nesse caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (Grattapaglia & Machado, 1998).

CONCLUSÕES

A ausência de luminosidade durante 30 dias não mostrou-se favorável ao desenvolvimento das brotações.

A utilização de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 associada à vedação dos frascos com filme PVC e a manutenção dos explantes diretamente em condições de luminosidade é recomendável para o desenvolvimento de brotos.

Os teores endógenos de auxina são suficientes para promover o enraizamento deste híbrido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, p. 343-347, 1984.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-296.

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

CARVALHO, G. R.; PIO, R.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; SCARANTE, M. J. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista Universitária Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 185-187, 1999.

COSTA, M. A. P. de C. et al. Efeito de diferentes concentrações de GA_3 no alongamento de brotações *in vitro* de jenipapo (*Genipa americana*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., **Anais...** Belém, 2004.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; KÄMPF, A. N. Propagação *in vitro* de *Limonium latifolium* Kuntze (*Plumbaginaceae*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 575-580, 2000.

GEORGE, E. F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture. Part 1.** –The technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.183-260.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.

PERES, L. E. P. et al. Effects of auxin cytokinin ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lind (*Orchidaceae*) into buds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 15, n. 4/5, p. 551-555, 1999.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987. 344.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R. Habituação. **Revista ABCTP Notícias**, Recife, n. 41, p. 4-10, ago. 2001.

SERRANO, M. S. ; PIÑOL SERRA, M. T. **Biotecnologia vegetal: ciências de la vida**. Ed. Síntesis, S.A. Madrid, p. 285, 1996.

SILVA, A. L. L. et al. Ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia marítima* Backer dispostos em agrupamento – bromeliaceae. **Caderno de Pesquisa - série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 2, p. 37-46, jul./dez. 2004.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea Brassocattleya Pastoral x Laeliocattleya Amber Glow**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotcna) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003.

SILVA, R. P. et al. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecária Brasileira**. Brasília, n. 12, v. 40, dez. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na organogênese *in vitro* do híbrido orquídea *B. flagellaris* x *C. harrisoniana* a partir de segmentos não meristemáticos, pode-se concluir que os segmentos mediais foliares não demonstraram resposta organogênica, necrosando os mesmos. Já com relação a polaridade dos segmentos foliares, verificou-se resposta organogenética, porém com pouca responsividade, no entanto experimentos futuros visando melhores respostas podem ser efetuados.

Segmentos internodais apresentaram viabilidade na organogênese *in vitro* deste híbrido, sendo assim é recomendado para o desenvolvimento de brotações adventícias. Para tanto, não se necessita de adição da citocinina BAP evidenciando assim um nível endógeno desta capaz de promover o surgimento dessas brotações. Assim, estes explantes podem ser utilizadas em futuros trabalhos de transformação genética.

O desenvolvimento *in vitro* foi satisfatório nas condições de fotoperíodo de 16 horas, vedação com PVC e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 , sendo assim recomendado para este híbrido. Além do que essa recomendação possui custo menor, fazendo com que a fase de desenvolvimento se torne mais viável. As brotações levadas para o escuro durante 30 dias e posteriormente colocadas em fotoperíodo de 16 horas, apresentaram necroses em todos os tratamentos não podendo desta forma ser avaliadas.

O híbrido possui níveis endógenos de auxina capazes de promover o enraizamento das brotações, não necessitando desta forma deste regulador para o desenvolvimento das raízes.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como um protocolo de morfogênese *in vitro* deste híbrido específico, já que cada espécie apresenta diferentes respostas aos mesmos estímulos.

ANEXO

ANEXO A. Descrição do meio de cultura utilizado nos experimentos.

Soluções estoque do meio MT (Murashige & Tucker, 1969)

MT Macronutrientes estoque (50x)	gL⁻¹
NH ₄ NO ₃	82,5
KNO ₃	95,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
KH ₂ PO ₄	7,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MT Micronutrientes estoque (100x)	gL⁻¹
H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ .H ₂ O	1,68
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
KI	0,083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
MT Ferro estoque (200x)	gL⁻¹
Na ₂ EDTA	7,45
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,57
MT Vitaminas estoque (100x)	gL⁻¹
Myo-nositol	10,0
Tiamina-HCL	1,0
Pyridoxina-HCL	1,0
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2
MT Cálcio estoque (66x)	gL⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	29,33

Composição do meio de cultura

MT

Macronutrientes estoque (50x)	20mL L ⁻¹
Micronutrientes estoque (100x)	10mL L ⁻¹
Vitaminas estoque (100x)	10mL L ⁻¹
Cálcio estoque (66x)	15mL L ⁻¹
Ferro estoque (200x)	5mL L ⁻¹
Sacarose	25 g L ⁻¹
Agar	8 g L ⁻¹