

JULIANA LISCHKA SAMPAIO MAYER

ANATOMIA E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Cymbidium* 'Joy Polis'
(Orchidaceae)

CURITIBA

2006

JULIANA LISCHKA SAMPAIO MAYER

**ANATOMIA E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Cymbidium* 'Joy Polis'
(Orchidaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana L. F. Ribas
Co-orientador: Prof. Dr. Henrique S. Koehler
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cleusa Bona

CURITIBA

2006

*DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS
DOIS GRANDES AMORES MARCELO E
ISABELA*

**"Grandes realizações são possíveis
quando se dá atenção aos pequenos
começos."**

(Lao Tse)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o período do curso.

À Profa. Dra. Marguerite Quoirin, por ter me aceitado como orientada, e que mesmo em viagem de estudos, manteve o incentivo e principalmente a confiança.

À Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, pela co-orientação no decorrer dos experimentos desta dissertação, além da amizade e incentivo.

À Profa. Dra. Cleusa Bona, pela orientação nas análises anatômicas, por possibilitar a realização de trabalhos à parte da dissertação e por todos os anos, desde o início da graduação, de amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Henrique Koehler, pela orientação estatística.

Ao Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, por possibilitar esse estudo.

Ao Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, em especial ao Biólogo Nilson Belém Filho, técnico do laboratório, pela amizade e pelos inúmeros auxílios na realização deste e de outros trabalhos.

Ao Biólogo Rogério Duílio Genari, por gentilmente ceder o material vegetal indispensável para a realização deste trabalho.

Às colegas de mestrado Marília P. Machado, Ana Cristina Atala Alves, Áurea P. Ferriani, Michele F. Bortolini e Juliany de Bitencourt, pela amizade, pelas longas conversas e pelos trabalhos realizados em conjunto.

À Engenheira Agrônoma Ana Carolina Theodoro de Carvalho Leitão, pelo importante auxílio durante a realização desse trabalho.

À minha família pelo incentivo e carinho.

E agradeço principalmente às duas pessoas que são o motivo e a inspiração para a realização desse trabalho, pois sem eles não haveria razão de ser. Ao meu marido, Marcelo Alexandre Mayer, por toda a ajuda e por sempre me incentivar a ir mais longe. E à minha filha Isabela Sampaio Mayer, sempre tão paciente e compreensiva apesar de tão novinha...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
2 CAPÍTULO I - Efeito da BAP na formação e na morfo-anatomia de protocormóides (PLBs) de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis'	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
2.1 INTRODUÇÃO.....	11
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.2.1 Condições de cultura <i>in vitro</i>	13
2.2.2 Origem do material vegetal.....	13
2.2.3 Regeneração de PLBs.....	14
2.2.4 Análise anatômica.....	16
2.2.5 Análise estatística.....	17
2.3 RESULTADOS.....	18
2.4 DISCUSSÃO.....	25
2.5 CONCLUSÃO.....	28
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
3 CAPÍTULO II - Efeito de ANA e BAP na regeneração e na morfo-anatomia de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis' a partir de discos de PLBs	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.2.1 Condições de cultura <i>in vitro</i>	37
3.2.2 Origem do material vegetal	37
3.2.3 Regeneração de PLBs	38
3.2.4 Análise anatômica	38
3.2.5 Análise estatística.....	39
3.3 RESULTADOS	40
3.4 DISCUSSÃO	51
3.5 CONCLUSÃO	54
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

4 CAPÍTULO III - Multiplicação <i>in vitro</i> de brotações de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis' (Orchidaceae)	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
4.1 INTRODUÇÃO	60
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
4.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO	62
4.4 CONCLUSÃO	65
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
5 CAPÍTULO IV - Aclimatização em diferentes substratos e morfo-anatomia de mudas micropropagadas de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis'	68
RESUMO	69
ABSTRACT	70
5.1 INTRODUÇÃO	71
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.2.1 Material	73
5.2.2 Substratos	73
5.2.3 Análise anatômica	75
5.3 RESULTADOS	77
5.3.1 Análise quantitativa das mudas	77
5.3.2 Resultados da análise anatômica	82
5.4 DISCUSSÃO	90
5.5 CONCLUSÃO	94
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
ANEXO	101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1.1 - *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. Planta matriz com flores; B. Planta matriz com brotação lateral; C. Brotação lateral; D. Brotação lateral com a gema exposta (seta). A. Barra = 3 cm; B. Barra = 1 cm; C. Barra = 2 cm; D. Barra = 0,5 cm.....15
- FIGURA 1.2 - *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. PLBs originados da região meristemática da gema após 60 dias no meio de cultura MS; B. Brotação com uma escala (vertical) indicando como foi realizada a medição da altura. Barra = 1 cm.....16
- FIGURA 1.3 - Número de PLBs regenerados por disco de PLB de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS em função da concentração de BAP após 90 dias.....19
- FIGURA 1.4 - Brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis', obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido ou não de BAP, após 90 dias. T1. sem BAP; T2. 5 μ M de BAP; T3. 10 μ M de BAP.; T4. 20 μ M de BAP; T5. 40 μ M de BAP. Barra = 1 cm.....20
- FIGURA 1.5 - Discos de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-D. Em meio de cultura sem fitoregulador; E-H. Em meio de cultura adicionado de 10 μ M de BAP; I-M. Em meio de cultura adicionado de 20 μ M de BAP. A, E e I. 21 dias de cultura; B, F e J. 30 dias de cultura; C, G e L. 45 dias de cultura; D, H e M. 60 dias de cultura; seta = PLBs laterais. Barra = 0,5 cm.....21
- FIGURA 1.6 - FIGURA 1.6 - PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. PLBs em vista geral (MEV); B. detalhe de um estômato na superfície do PLB (MEV); C. Secção transversal do PLB no dia zero; D. Secção longitudinal do PLB no dia zero, observar o meristema apical envolvido pelo coleóptile; E-H. PLBs cultivados em meio de cultura sem a adição de BAP; E. Secção do PLB aos nove dias de cultura; F. Secção do PLB aos 12 dias de cultura, observar a origem de ápices meristemáticos; G. Secção do PLB aos 21 dias de cultura, observar dois ápices meristemáticos (setas); H. Secção do PLB aos 30 dias de cultura, verificar o início do estrangulamento na base do novo PLB formado (seta). co = coleóptile. cp = cordão procambial. cv = conexão vascular. mac = meristema apical caulinar. Barra A= 500 μ m. Barra B= 10 μ m. Barra C-H= 400 μ m.....22
- FIGURA 1.7 - Secções de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-D. cultivados em meio de cultura adicionado de 10 μ M de BAP. E-I cultivados em meio de cultura adicionado de 20 μ M de BAP. A,E Secção do PLB aos nove dias de cultura; B,F. Secção do PLB aos 12 dias de cultura; C,G. Secção do PLB aos 21 dias de cultura; D,H-I. Secção do PLB aos 30 dias de cultura, observar um PLB lateral (seta). I. Detalhe da camada de abscisão (seta).co = coleóptile. cp = cordão procambial Barra A, E, F e I= 200 μ m. Barra B-D, G e H = 400 μ m.....24
- ### CAPÍTULO II
- FIGURA 2.1 - Número de PLBs regenerados por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de 40 μ mol.m⁻².s⁻¹). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.....40

- FIGURA 2.2 - Altura das plantas regeneradas por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.....41
- FIGURA 2.3 - Porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....42
- FIGURA 2.4 - Plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) após 90 dias. Seta = raiz. Barra = 1 cm.....43
- FIGURA 2.5 - Número de PLBs regenerados por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%....44
- FIGURA 2.6 - Número de plantas regeneradas por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%....44
- FIGURA 2.7 - Altura das plantas regenerados por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%....45
- FIGURA 2.8 - Porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....46
- FIGURA 2.9 - Plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Seta = raiz. Barra = 1 cm.....47
- FIGURA 2.10 - Discos de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-H. Discos de PLBs cultivados em meio de cultura adicionado de $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado a $0,5 \mu\text{M}$ de BAP; A-D cultivados sob iluminação; E-F. cultivados no escuro; G. sob iluminação a 15 dias; H. sob iluminação a 30 dias A. e E. 21 dias de cultura; B. e F. 30 dias de cultura; C. e G. 45 dias de cultura; D. e H. 60 dias de cultura. r = raiz. Seta = coleóptile. Barra = $0,5 \text{ cm}$48

FIGURA 2.11 - Secções de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura adicionado de 0,5 µM de ANA combinado a 0,5 µM de BAP. A-E. mantidas sob iluminação. F-I. mantidas no escuro. A-B,F. aos nove dias de cultura; C,G. aos 12 dias de cultura; D,H. aos 21 dias de cultura, observar o início do estrangulamento na base do novo PLB formado (seta); E-I. aos 30 dias de cultura. co = coleóptile. cp = cordão procambial. Barra A, C, F e G= 200 µm. Barra B, D-E, I e H= 400 µm.....50

CAPÍTULO III

FIGURA 3.1 - A-B. Brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP combinado com AIB. T1. sem BAP; T2. 2,5 µM de BAP; T3. 5 µM de BAP; T4. 10 µM de BAP; T5. 2,5 µM de BAP e 0,5 µM de AIB; T6. 5 µM de BAP e 0,5 µM de AIB; T7. 10 µM de BAP e 0,5 µM de AIB. Barra = 2,0 cm.....64

FIGURA 3.2 - A-B. Enraizamento de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de carvão ativado, após 30 dias. Barra = 2,0 cm.....65

CAPÍTULO IV

FIGURA 4.1 - Diferentes substratos utilizados para a aclimatização de mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Barra: 4 cm.....74

FIGURA 4.2 - Porcentagem de ganho na massa fresca de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....78

FIGURA 4.3 - Número médio de raízes de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....79

FIGURA 4.4 - Comprimento das 3 maiores raízes de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....80

FIGURA 4.5 - Detalhe das mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis' após 45 dias da aclimatização nos diferentes substratos. Barra = 3 cm.....81

FIGURA 4.6 - Vista geral de um segmento da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. A. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, B. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, C. Planta aclimatizada. Barra A-C: 500 µm.....83

FIGURA 4.7 - Secções longitudinais do ápice de raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, B. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, C. Planta aclimatizada. co = coifa. mf = meristema fundamental. pc = procâmbio. pm = promeristema. pt = protoderme. seta = idioblastos com ráfides. Barra: 100 µm.84

FIGURA 4.8 - Secções transversais da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A e B. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C e D. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, E e F. Planta aclimatizada. c = córtex. cv = cilindro vascular. ex = exoderme. en = endoderme. fl = floema. m = medula. x = xilema. v = velame. Barra A, C e E: 300 µm. Barra B, D e F: 200 µm.....85

FIGURA 4.9 - Vista frontal da epiderme abaxial de folhas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. A. e B. planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C.e D. planta cultivada no ambiente *in vitro*, E. e F. planta aclimatizada. Barra A, C e E: 2500 µm. Barra B, D e F: 50 µm.....88

FIGURA 4.10 - Secções transversais da nervura e do limbo de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A e B. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C e D. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, E e F. Planta aclimatizada. B, D e F. Observar detalhe da epiderme de ambas as faces. fi = fibras. ra = idioblastos com ráfides
Barra: 200 µm. Barra detalhe da epiderme: 25 µm.....89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1.1 - Regeneração de PLBs a partir de discos de PLB de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura MS acrescido ou não de BAP após 90 dias.....	19
---	----

CAPÍTULO III

TABELA 3.1 - Resultados de multiplicação de brotações de <i>Cymbidium</i> 'Joy Polis' cultivadas em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP combinado com AIB, após 90 dias.....	62
---	----

CAPÍTULO IV

TABELA 4.1 - Caracterização dos diferentes substratos e misturas pela análise de rotina.....	76
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB	-	Ácido indolbutírico
ANA	-	Ácido naftaleno acético
BAP	-	6-benzilaminopurina
FAA	-	Solução de formol + ácido acético + etanol
KC	-	Knudson (1946)
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	-	Murashige e Skoog (1962)
PLBs	-	Protocormóides (“protocorm like body”)
2,4 D	-	ácido 2,4 diclorofenoxiacético

RESUMO

Orchidaceae é considerada a maior família de plantas com flores, englobando cerca de 35 mil espécies, o que corresponde a um sétimo de todas as plantas com flores. O gênero *Cymbidium* é constituído por um grupo numeroso de espécies e de plantas híbridas, estas últimas originadas a partir de trabalhos hortícolas de melhoramento genético. A multiplicação deste gênero possui limitações como baixas taxas de germinação e alta especificidade nos processos de desenvolvimento. Além disso, plantas híbridas dificilmente produzem sementes e quando as produzem, estas são na maioria inférteis. Desse modo, técnicas de propagação *in vitro* que possibilitem e acelerem a produção de mudas são essenciais para a horticultura. Outra vantagem da micropropagação é a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente. A micropropagação vem sendo utilizada como método de propagação clonal em larga escala de plantas comercialmente importantes, como por exemplo, espécies da família Orchidaceae. O material de estudo foi o híbrido de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Este híbrido possui uma inflorescência ereta com flores numerosas de coloração avermelhada, a qual é muito apreciada comercialmente, e para tanto, se necessita de mudas de boa qualidade fitossanitária em grande quantidade. Sendo assim, a multiplicação desse híbrido por meio da micropropagação possibilitará a produção massal de mudas. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação a partir de meristemas obtidos de gemas axilares, acompanhado de análises morfo-anatômicas. Foram testadas diferentes concentrações e diferentes fitorreguladores, isolados ou combinados para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* deste híbrido. Além disso, foi descrita a morfo-anatomia do desenvolvimento do disco de protocormóide (PLB) até a formação de novos PLBs e foram estabelecidas as condições adequadas para a aclimatização de mudas em casa-de-vegetação.

Palavra-chave: Orquídea, micropropagação, fitorreguladores, morfologia

ABSTRACT

The Orchidaceae are considered the biggest family of flowering plants, with about 35.000 species, which represent the seventh part of all flowering plants. *Cymbidium* genus is formed by a numerous group of species and hybrids, the last one originated through genetic improvement. Hybrid plants rarely produce seeds and even when they produce, they are almost infertile. Thus *in vitro* techniques that accelerate the plant multiplication are essential for horticulture. Another advantage of micropropagation is the possibility to obtain homogeneous populations originated from genetically improved plants. Micropropagation has been used to clone commercially important species in large scale, for example Orchidaceae species. The chosen species was *Cymbidium* 'Joy Polis'. This hybrid has an erect inflorescence with numerous red flowers, that is commercially appreciated, and so, needs a large number of plants with good sanitary conditions. The multiplication of this hybrid through micropropagation will thus enable plant mass production. The objective of this work was to establish a micropropagation protocol using axillary buds. Different concentrations of two growth regulators (BA and NAA), alone or combined, were tested in order to improve the *in vitro* multiplication rate of this hybrid. Morphology and anatomy of transverse sections of protocorm-like body (PLB) forming new PLBs were described and the adequate conditions of plant acclimatization in green house were established.

Key words: Orchid, micropropagation, growth regulator, morphology

1 INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é provavelmente a maior família de plantas com flores, sendo estimadas em cerca de 35 mil espécies distribuídas em aproximadamente 1800 gêneros, correspondendo a um sétimo de todas as plantas com flores. Estão amplamente distribuídas, porém com maior diversidade nas montanhas tropicais (DRESSLER, 1993; WATANABE, 2002). Orquídeas são monocotiledôneas, herbáceas e perenes, podendo ser epífitas, terrestres e rupícolas (BLACK, 1984). O gênero *Cymbidium* é constituído por um grupo numeroso de espécies e plantas híbridas originadas a partir de trabalhos de melhoramento genético (LORENZI e SOUZA, 2001).

As orquídeas produzem um grande número de sementes, cada cápsula pode conter até 500 mil sementes (WATANABE, 2002). Porém, em condições naturais, estima-se que somente 5% delas germinam. Isto ocorre em virtude destas sementes não possuírem endosperma com reservas nutritivas e não possuírem a capacidade de utilizar diretamente o substrato na natureza, necessitando de associação com micorrizas (RAO, 1977; BAJAJ, 1992). Além disso, mudas obtidas por fecundação cruzada possuem alta taxa de heterogeneidade, não sendo portanto esta técnica a mais indicada para produção em larga escala (PIERIK, 1990). Os métodos convencionais de propagação vegetativa pela separação, divisão de touceiras ou de pequenas mudas que se formam nos rizomas e em hastes florais são extremamente lentos, apesar de proporcionarem uma descendência geneticamente idêntica à planta matriz (SAGAWA e KUNISAKI, 1984). Portanto, esse método também não é viável em escala comercial (REINERT e MOHR, 1967).

A multiplicação de *Cymbidium* possui limitações como uma baixa taxa de germinação. Além disso, plantas híbridas dificilmente produzem sementes ou quando as produzem são na maioria estéreis. Portanto, técnicas de propagação *in vitro* que possibilitem e acelerem a produção de mudas são essenciais para a horticultura. Outra vantagem da micropropagação é a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (HASEGAWA e GOI, 1987).

Técnicas de propagação *in vitro* aceleram a produção de mudas e são essenciais para a horticultura (MUKHOPADHYAY e ROY, 1994). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura, o mercado internacional de flores e plantas ornamentais movimenta anualmente em torno de 100 bilhões de dólares (IBRAFLOR, 2003). O principal importador e exportador desses produtos é a Holanda, que, em 1995, comercializou 67 milhões de dólares somente em orquídeas do gênero *Cymbidium* (CASTRO, 1998). O desenvolvimento do método de germinação de sementes *in vitro* por Knudson, em 1922, abriu caminho para outros estudos visando à propagação vegetativa *in vitro* (READ e SZENDRÁK, 1998).

Técnicas de propagação *in vitro* de orquídeas também são citadas por vários autores como meio de conservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (AGRAWAL et al., 1991; SEENI e LATHA, 1992; De PAUW et al., 1995; RAMSAY e STEWART, 1998).

A micropropagação é utilizada para a propagação clonal em grande escala de plantas comercialmente importantes, como, por exemplo, espécies da família Orchidaceae. As maiores vantagens do cultivo *in vitro* são a multiplicação rápida e a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (GOVIL e GUPTA, 1997). Nessa técnica podem ser utilizados tecidos meristemáticos, constituídos por grupos de células indiferenciadas, que estão localizados nos ápices de caule e raiz e nas axilas das folhas. As células desse tecido são totipotentes, isto é, possuem a capacidade de se regenerar e se diferenciar em diferentes órgãos e tecidos (KYTE e KLEYN, 1996). Os tecidos meristemáticos possuem maior estabilidade na regeneração de plantas do que tecidos diferenciados, pois nesses tecidos não há a necessidade de formação de calos (LAMEIRA et al., 2000).

A cultura *in vitro* de tecidos meristemáticos permite produzir centenas de clones de plantas previamente selecionadas, muitas delas híbridas, mantendo assim o genótipo e fenótipo, e ainda eliminar vírus de plantas matrizes infectadas (CASTRO et al., 2002). A eliminação de vírus é baseada no fato de que a região meristemática é a única não infectada devido à alta taxa de divisão celular e a ausência do sistema vascular (NORTHEN, 1990; CARVALHO, 1999). Essa limpeza viral é muito importante em razão de não existirem espécies de orquídeas totalmente resistentes (WISLER et al., 1986). Mudas destacadas de plantas contaminadas

carregam consigo a infecção viral. A transmissão viral também se dá pelo método de colheita de flores, com o uso de instrumental contaminado, ampliando a disseminação nos orquidários (ZETTLER et al., 1978). Os vírus mais frequentes são o do mosaico do *Cymbidium* e da mancha-anelar do *Odontoglossum*. Plantas infectadas são geralmente incineradas (ISHII, 1974).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada. Essas gemas são estimuladas a crescer formando protocormóides (“protocorm like body” ou PLBs) que, cultivados, originam novos explantes (CARVALHO, 1999). Protocormóides são caracterizados como estruturas semelhantes aos protocormos que são gerados a partir da germinação de sementes de orquídeas, os quais são descritos como uma pequena estrutura esférica e esverdeada. Na maioria das orquídeas as gemas laterais são claramente visíveis nas axilas das folhas, parecendo como uma pequena saliência (ARDITTI e ERNST, 1993).

Para a cultura de células, tecidos ou órgãos de plantas são utilizados meios nutritivos para fornecer as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Além disso, a composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio determinam o padrão de desenvolvimento (CASTRO et al., 2002). Para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais de orquídeas utiliza-se o meio de cultura inicial líquido para a formação de PLBs. Já para evolução destes em plântulas utiliza-se o meio sólido (PIERIK, 1990). Meio de cultura líquido, quando agitado, aumenta o contato entre os tecidos e o meio melhorando o crescimento e desenvolvimento (ARDITTI e ERNST, 1993). No entanto, estudos indicam que meristemas de *Cymbidium* quando cultivados em meio de cultivo líquido ou sólido não apresentam diferenças no desenvolvimento tanto para meristema apical como para meristema de gemas laterais (DALLA ROSA e LANERI, 1977).

Os meios de cultivo mais empregados para este gênero são o de MURASHIGE e SKOOG (1962) (MS) e o de KNUDSON (1946) (KC). A adição de fitorreguladores melhora o desenvolvimento e crescimento dos PLBs. A adição de ácido naftaleno acético (ANA), de 5,37 a 53,71 μM , parece aumentar consideravelmente a produção de brotações durante os primeiros noventa dias de cultivo, principalmente quando combinada à 44,38 μM de BAP (6-benzilaminopurina) (ARDITTI e ERNST, 1993).

Um dos maiores problemas encontrados no cultivo *in vitro* de explantes de orquídeas é a exsudação fenólica. Portanto, são necessários estudos para desenvolver um protocolo que aumente o rendimento e eficiência desta técnica (GEORGE, 1993). Segundo ARDITTI e ERNST (1993) as publicações sobre a cultura de células e tecidos vegetais a partir de orquídeas adultas são escassas e os protocolos necessitam de maior detalhamento, constatando-se isso até os dias atuais. Nas publicações mais antigas, muitas vezes não são explicitados dados numéricos como o número de repetições, número de explantes que produziram PLBs ou que morreram, ou ainda partem de um número muito reduzido de explantes, não possibilitando uma análise estatística satisfatória (WIMBER, 1963).

Dessa forma foi desenvolvido um protocolo de micropropagação, a partir de meristemas obtidos de gemas axilares, utilizando discos de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Anexo 1), acompanhado de estudos morfo-anatômicos.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, D. C.; PAWAR, S. S.; MORWAL, G. C.; MASCARENHAS, A. F. In vitro micropropagation of *Delphinium malabaricum* (Huth) Munhz, arae species. **Annals of Botany**, v. 68, p 243-245, 1991.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.
- BAJAJ, Y. P. S. **High-tech and micropropagation IV (Biotechnology in agriculture and forestry, nº 20)**, New York: Springer-Verlag, 1992. 497 p.
- BLACK, P. M. **Orquídeas**. Rio de Janeiro: Livro Técnico S/A, 1984. 128 p.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa, 1999. 39 p.
- CASTRO, C. E. F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.4, n. 1, p. 1-46, 1998.
- CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. 255 p.
- DALLA ROSA, M.; LANERI, U. Modification of nutrient solutions for germination and growth *in vitro* of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. **American Orchid Society Bulletin**, vol. 46, p. 813-820, 1977.
- De PAUW, M. A.; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E.; The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, vol. 75 p. 267-275, 1995.
- DRESSLER, L. R. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314 p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - part 1: the technology**. 2^a ed. Edington: Exegetics Limited, 1993. 574 p.
- GOVIL, S.; GUPTA, S. C. Comercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 65-73, 1997.
- HASEGAWA, A.; GOI, M. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. and *Cymbidium kanran* Makino in Shoot-Tip culture. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, vol. 56, n. 1, p. 70-78, 1987.
- IBRAFLO. HomePage do Instituto Brasileiro de Floricultura. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br/ibraflor/index.php?id=23>> Acesso em 15 de agosto de 2003.

ISHII, M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. **Acta Horticulturae**, v. 36, p. 229-233, 1974.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214-217, 1946.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes, an introduction to micropropagation**. 3^a ed. Portland: Timber Press, 1996. 240 p.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3^a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088 p.

MUKHOPADHYAY, K.; ROY, S. C. *In vitro* induction of "runner"- a quick method of micropropagation in Orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 56, p. 331-337, 1994.

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

NORTHERN, R. T. **Home orchid growing**. 4^a ed. Simon & Schuster Inc, 1990. 376 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3^a ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

RAMSAY, M. M.; STEWART, J. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 126, p. 173-181, 1998.

RAO, A. N. Tissue culture in orchid industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**. New York: Springer Verlag, 1977. p. 44-69.

READ, P. E.; SZENDRÁK, E. Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. **Acta Horticulturae**, v. 461, n. 2, p. 93-103, 1998.

REINERT, R. A.; MOHR, H. C. Propagation of *Cattleya* by tissue of lateral bud meristems. **American Society for Horticultural Science**, v. 91, p. 664-671, 1967.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J. T. Clonal propagation: Orchids. **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants**, v. 1, p. 61-67, 1984.

SEENI, S.; LATHA, P. G. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, v. 29, p. 167-172, 1992.

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo: 506 fotos de espécies**, São Paulo: AOSP – Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. 296p.

WIMBER, D. E. Clonal multiplication of *Cymbidiums* through tissue culture of the shoot meristem. **American Orchid Society Bulletin**, vol. 32, p. 105-107, 1963.

WISLER, G. C., ZETTLER, F. W., SHEEHAN, T. J., Common questions and misconceptions concerning orchids viruses. **American Orchid Society Bulletin**, vol. 55, n. 5, p. 472-479, 1986.

ZETTLER, F. W.; HENNEN, G. R.; BODNARUX, W. H.; CLIFFORD, H. T.; SHEEHAN, T. J. Wild and cultivated orchids surveyed in Florida for the *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum ringspot* viruses. **Plant Disease Reporter**, v. 62, n. 11, p. 949-952, 1978.

CAPÍTULO I

Efeito da BAP na formação e na morfo-anatomia de protocormóides
(PLBs) de *Cymbidium* ‘Joy Polis’

RESUMO

O gênero *Cymbidium* Hort., pertencente à família Orchidaceae, é constituído por um grupo numeroso de espécies e plantas híbridas importantes economicamente como plantas ornamentais. Protocormóides (“protocorm like body” ou PLBs) são estruturas muito semelhantes ao protocormo, o qual é a extensão do estágio embrionário que ocorre durante a germinação das sementes de orquídeas. PLBs apresentam alto potencial morfogênico, demonstrando alta capacidade de regeneração. Dessa forma, têm sido utilizados como explantes. Essa técnica tem como vantagens a economia de tempo e de material, além de ser mais eficiente que outras técnicas convencionais que utilizam outras partes da planta como explantes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de PLBs com a utilização de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). PLBs oriundos de meristemas, de *Cymbidium* ‘Joy Polis’, foram seccionados transversalmente, dando origem a dois discos de 0,7 a 1,0 mm de espessura e 0,3 a 0,4 cm de diâmetro. O meio de cultura utilizado foi o MS com a adição de BAP nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20 e 40 μM . Após 90 dias foram avaliados o número médio de PLBs, brotações e plantas formados por disco, a altura das brotações acima de 0,5 cm e a porcentagem de explantes necróticos. A origem dos PLBs foi direta pela proliferação das células das camadas epidérmicas e subepidérmicas. O tratamento com 20 μM de BAP foi melhor para a variável número médio de PLBs por disco (9,95). Porém, somente os tratamentos com 5 e 10 μM de BAP apresentaram brotações (3,29 e 1,61 por disco), além de PLBs (2,71 e 6,72 PLBs por disco, respectivamente). Explantes necróticos foram encontrados em todos os tratamentos, porém em maior porcentagem no tratamento com 40 μM de BAP (26%). A concentração de 20 μM de BAP foi a mais indicada para a regeneração dos discos de PLBs.

Palavras chave: Orchidaceae, micropropagação, propagação *in vitro*, fitorregulador.

ABSTRACT

The *Cymbidium* Hort. genus, Orchidaceae family, has numerous species and hybrids, which are economically important as ornamental plants. Protocorm-like bodies (PLBs) are structures very similar to the protocorm, which is the extension of the embryonic state after orchid seed germination. PLBs have high morphogenetic potential, showing high regeneration capacity. So, they have been used as explants for multiplication. The advantages of this technique are the shorter time, use of few material and the fact that it is more efficient than other techniques that uses explants from other plant parts. The objective of this study was to develop an efficient protocol for regeneration from PLBs, by the addition of N⁶ – benzyladenine (BA) at different concentrations, into culture medium. PLBs obtained from meristems of *Cymbidium* 'Joy Polis', were cut transversally, forming two thin sections 0.7 to 1 mm thick and with 0.3 to 0.4 cm of diameter. The culture medium was MS, supplemented with the following BA concentrations: 0; 5; 10; 20 and 40 µM. After 90 days, the number of PLBs, shoots and plants formed per section, the shoot height up to 0.5 cm and the percentage of necrotic explants were evaluated. The PLBs were originated directly by proliferation of cells from the epidermal and subepidermal layers. The concentration of 20 µM BA gave the best number of PLBs per section (9.95). Shoots were observed only in the treatments with 5 and 10 µM BA (3.29 and 1.61 per section, respectively), as well as PLBs (2.71 and 6.71 per section, respectively). Necrotic explants appeared in all treatments, but in higher rates in the presence of 40 µM BA (26%). The concentration of 20 µM BA was the most indicated for regeneration from PLBs sections.

Key words: Orchidaceae, micropropagation, *in vitro* propagation, growth regulator

2.1 INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de orquídeas são acotiledonares e seu embrião pode ser comparado à fase globular dos embriões das dicotiledôneas por se apresentar como uma massa de células indiferenciadas (HARRISON e ARDITTI, 1978). Esses autores também observaram nos protocormos dois tipos celulares: células pequenas e com conteúdo denso no pólo meristemático e, no pólo oposto, células com núcleos evidentes e vacúolos. Segundo LEROUX et al. (1997), a região apical do protocormo constitui um promeristema e logo abaixo dessa região observam-se cordões de células procambiais e a porção basal formada por tecido parenquimático.

A presença de protocormos é única dentre as fanerógamas e pode ser considerada como uma extensão do estágio embrionário que ocorre fora das sementes (DRESSLER, 1993; LEROUX et al., 1997). O desenvolvimento do protocormo após a germinação da semente é lento e ocorre com o aumento de volume e diferenciação dos tecidos, originando a plântula (BARABÉ et al., 1993).

De acordo com ARDITTI e ERNST (1993), explantes como tecidos ou calos de orquídeas *in vitro* formam PLBs, os quais são caracterizados como estruturas semelhantes aos protocormos. Porém, na literatura são escassos os trabalhos que demonstrem a real semelhança entre esses dois tipos de estruturas. Nos últimos anos, o PLB tem sido utilizado como explante, pelo uso de discos transversais, para acelerar a multiplicação *in vitro* de algumas espécies de orquídeas. Esse uso se deve ao alto potencial morfogênico dos PLBs. Como os PLBs demonstram alta capacidade de regeneração, essa técnica tem como vantagens a economia de tempo e de material, além de ser mais eficiente que outras técnicas convencionais que utilizam outras partes da planta como explantes. No entanto, esse sistema de cultura tem sido pouco explorado para espécies de orquídeas comercialmente importantes (NAYAK et al., 2002).

BEGUM et al. (1994) utilizaram discos longitudinais de PLBs oriundos da cultura *in vitro* de região apical de brotações de *Cymbidium*. Esses discos possuíam a capacidade de produzir novos PLBs quando cultivados na presença de 4,4 μM de BAP e 0,54 μM de ANA, sendo que todos os explantes formaram novos PLBs em oito semanas.

Utilizando a região apical de plântulas derivadas de germinação *in vitro* da espécie *Cymbidium aloifolium* (Orchidaceae), desenvolveram-se PLBs, após 50 - 60 dias, nos quais foram feitas secções transversais de aproximadamente 0,5 mm de espessura. A regeneração dos discos com a formação de novos PLBs foi melhor em meio de cultivo MS com a adição de 14 μM de zeatina ribosídeo (ZR) e 22 μM de BAP, apresentando, respectivamente, 89,03% e 68,03% de explantes que formaram PLBs em 10 semanas (NAYAK et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de PLBs, comparando diferentes concentrações da citocinina BAP e acompanhar as alterações morfológicas e histológicas durante a regeneração dos PLBs.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal e a análise anatômica no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

2.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As lâmpadas utilizadas foram do tipo luz branca da marca Philips® 32W/64RS, as quais ficavam a uma distância de 40 cm dos frascos. Os frascos utilizados nos experimentos possuíam três centímetros de diâmetro e sete centímetros de altura, capacidade de 55 ml, e continham 10 ml de meio de cultura e foram tampados com alumínio e vedados com filme de PVC.

2.2.2 Origem do material vegetal

Foram coletadas brotações laterais de 5 a 7 cm de comprimento de híbridos de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Figura 1.1A). Estas foram fornecidas pela RF Orquídeas situada em Campo Largo, Paraná.

As brotações laterais do gênero *Cymbidium* (Figuras 1.1B-C), descritas acima, foram desinfestadas com etanol 70% por 5 minutos, e em seguida em hipoclorito de sódio a 2% com Tween 20 a 0,1% por 15 minutos. Posteriormente, foram feitas lavagens em água destilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico e com pinças e bisturis foram expostas as gemas (Figura 1.1D) e isolada a região meristemática com dois primórdios foliares adjacentes. Os meristemas foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem a

adição de fitorreguladores, inicialmente ficaram 15 dias no escuro e posteriormente sob fotoperíodo de 16 horas.

Foram utilizados como fonte de explantes os PLBs formados a partir dos meristemas após 60 dias. Durante quatro semanas foram avaliadas a porcentagem de contaminação microbiana, de oxidação fenólica e de sobrevivência dos explantes.

2.2.3 Regeneração de PLBs

Os PLBs oriundos dos meristemas (Figura 1.2A) foram seccionados transversalmente, com o auxílio de microscópio estereoscópico, dando origem a dois discos de 0,7 a 1,0 mm de espessura e 0,3 a 0,4 cm de diâmetro, eliminando o ápice e a base.

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), com pH ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O fitorregulador testado foi BAP nas seguintes concentrações: 0; 5; 10; 20 e 40 µM. Após 90 dias da instalação do experimento, foram avaliados: o número médio de PLBs formados por disco de PLB, o número médio de brotações, o número médio de plantas (os explantes que apresentavam parte aérea e raiz desenvolvidas), a altura das brotações e plantas acima de 0,5 cm e a porcentagem de explantes necróticos. A medida da altura foi realizada da base do explante até a região de abertura das folhas (Figura 1.2B). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo testados cinco tratamentos com cinco repetições. A unidade experimental foi dez frascos com um explante cada, totalizando 250 explantes para o experimento.

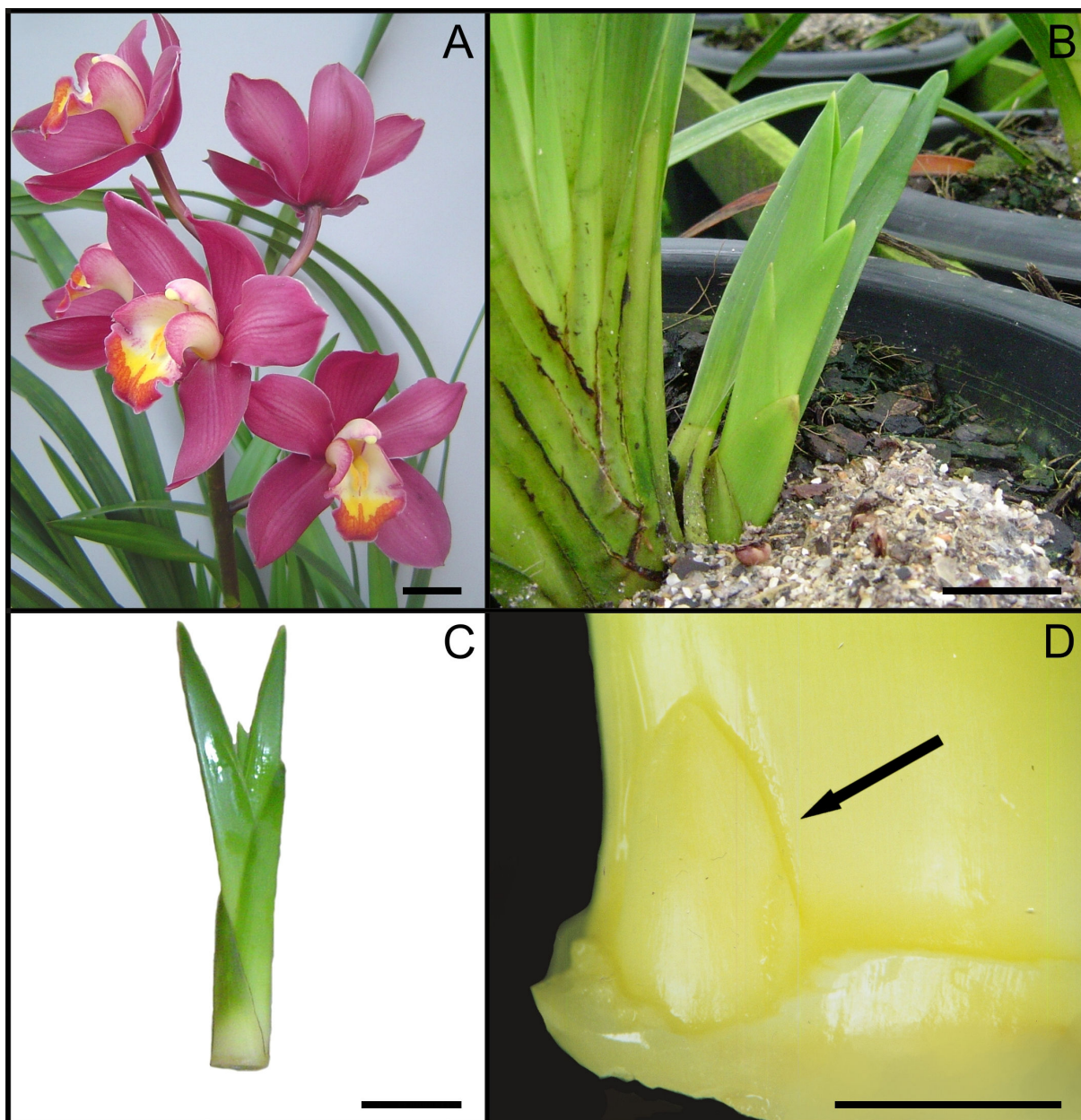


FIGURA 1.1 - *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. Planta matriz com flores; B. Planta matriz com brotação lateral; C. Brotação lateral; D. Brotação lateral com a gema exposta (seta). A. Barra = 3 cm; B. Barra = 1 cm; C. Barra = 2 cm; D. Barra = 0,5 cm.

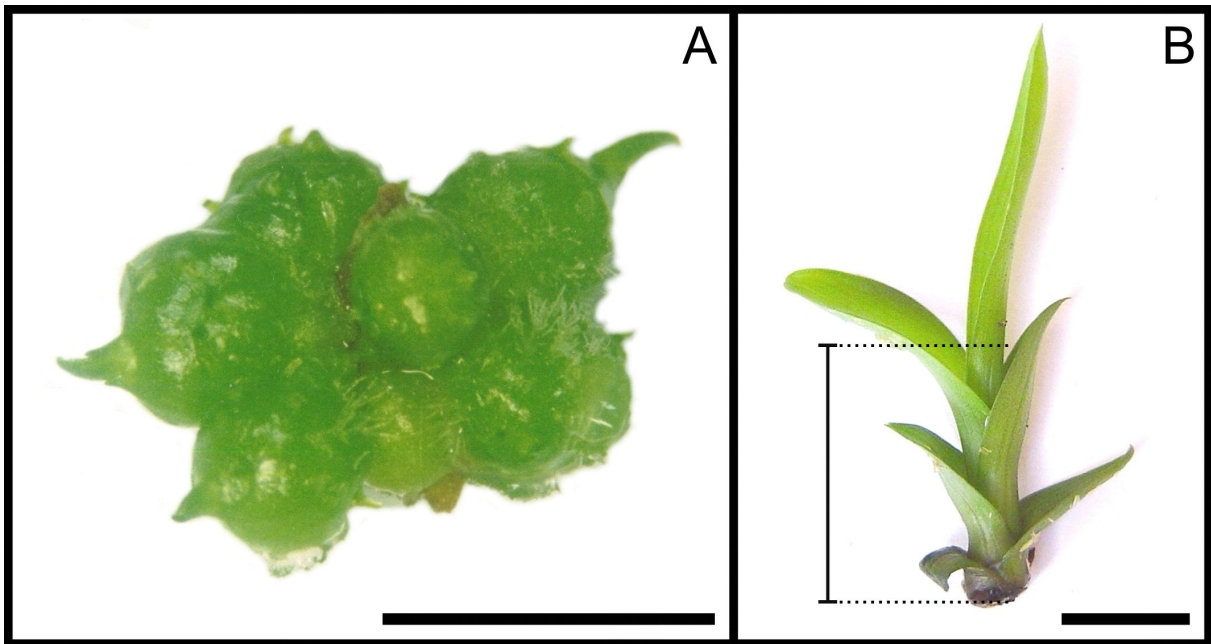


FIGURA 1.2 - *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. PLBs originados da região meristemática da gema após 60 dias no meio de cultura MS; B. Brotação com uma escala (vertical) indicando como foi realizada a medição da altura. Barra = 1 cm.

2.2.4 Análise anatômica

Para a análise anatômica qualitativa, foram coletadas amostras de discos de PLBs cultivados *in vitro* sem BAP, com 10 e 20 μM de BAP, a cada três dias, as quais foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940). Esses materiais foram destinados à preparação de lâminas permanentes, sendo incluídos em metacrilatoglicol (historresina-Leica), segundo a técnica de FEDER e O'BRIEN (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação, e os cortes de 7 μm de espessura foram corados com azul de toluidina (FEDER e O'BRIEN, 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte®). As fotomicrografias foram realizadas em microscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P200® acoplada.

Para a análise da superfície dos PLBs em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material botânico foi fixado em FAA 70, desidratado em série alcoólica etílica, e posteriormente pelo método do ponto crítico com CO_2 no aparelho Bal-Tec CPD 030. Após o ponto crítico, o material foi colado em suportes metálicos e metalizado com ouro, a vácuo, no equipamento Balzers Union FL 9496

SCD 030. A análise e o registro eletromicrográfico foram realizados com Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol (JSM 6360 LV), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância. Inicialmente, as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram as médias dos tratamentos testadas por meio do teste de F, enquanto que as que apresentaram heterogeneidade tiveram seus valores transformados para posterior análise. Quando as médias dos tratamentos foram diferentes estatisticamente, essas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS

Os meristemas utilizados para a produção de explantes apresentaram 36% de contaminação bacteriana e 10% de oxidação fenólica. A alta porcentagem de contaminação provavelmente deve-se ao fato de as brotações laterais se desenvolverem próximas ao solo, dificultando uma eficiente desinfestação do material. Dos meristemas inoculados, 54% sobreviveram e destes, 76,67% produziram PLBs, possibilitando o desenvolvimento do experimento.

Os resultados das análises de variância para as variáveis analisadas são apresentados nos Anexos 2 a 6 e o teste de Tukey para as médias de número de PLBs formados e altura das brotações na Tabela 1.1.

A equação de regressão, ajustada para número médio de PLBs formados por disco de PLB em função das concentrações de BAP testadas, revelou que o número de PLBs tende a crescer com a elevação da concentração de BAP, até alcançar uma concentração estimada de BAP de 25,23 μM , iniciando uma queda no número de PLBs com o aumento da concentração até 40 μM de BAP (Figura 1.3).

Nos tratamentos com 20 e 40 μM de BAP, os explantes formaram uma massa verde escura com pequenos PLBs (Figuras 1.4 T₄ e T₅) e não apresentaram brotações ou plantas (Tabela 1.1). O tratamento com melhores resultados foi 10 μM de BAP, pois formou PLBs e brotações, os quais somados resultaram num total de 8,33 (6,72 + 1,61) e somente 4% de explantes necróticos. No entanto, o tratamento com 20 μM de BAP resultou em 9,95 PLBs formados por disco e 14% de explantes necróticos. Dessa forma, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 10 e 20 μM de BAP. As plantas do tratamento sem fitorregulador desenvolveram raízes e folhas alongadas (Figura 1.4 T₁). Explantes necróticos foram encontrados em todos os tratamentos, porém em maior porcentagem no tratamento com 40 μM de BAP, sendo que esses explantes morreram e não desenvolveram PLBs.

Os PLBs em na presença de BAP, quando tranferidos para o meio de cultura sem fitorregulador, desenvolveram-se com a emissão da parte aérea e raiz.

TABELA 1.1 - Regeneração de PLBs a partir de discos de PLB de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura MS acrescido ou não de BAP após 90 dias.

Concentração de BAP (μM)	Número médio de brotações por disco de PLB*	Número médio de plantas por disco de PLB	Altura das brotações (cm)	Explantos necróticos (%)
0	0 c	1,54 a	1,14 a	12 b
5	3,29 a	0,19 b	0,71 b	4 b
10	1,61 b	0 b	0,67 b	4 b
20	0 c	0 b	---	14 b
40	0 c	0 b	---	26 a
Coefficiente de variação (%)	3,09	28,94	14,92	44,10

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

*variável transformada por raiz quadrada

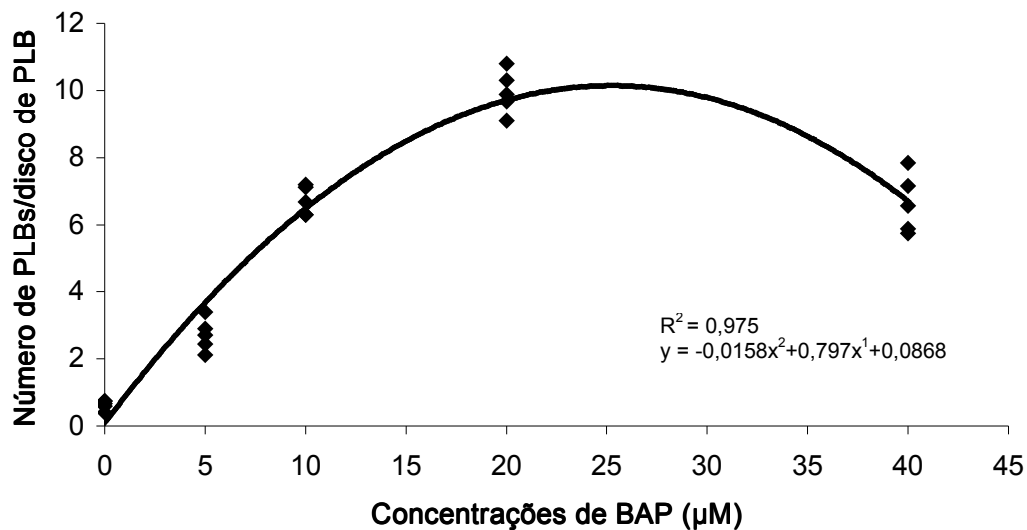


FIGURA 1.3 - Número de PLBs regenerados por disco de PLB de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS em função da concentração de BAP após 90 dias.



FIGURA 1.4 - Brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis', obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido ou não de BAP, após 90 dias. T1. sem BAP; T2. 5 μ M de BAP; T3. 10 μ M de BAP.; T4. 20 μ M de BAP; T5. 40 μ M de BAP. Barra = 1 cm.

Os discos de PLBs, no meio de cultura sem fitorregulador, formam uma protuberância aos 21 dias, a qual, aos 30 dias, está diferenciada em um PLB com região apical e pêlos na base. Esse novo PLB formado, aos 45 dias, apresenta região apical desenvolvida com a emergência de primórdios foliares e aos 60 dias é possível observar a emissão da raiz (Figura 1.5A-D). Nos meios de cultura com 10 e 20 μ M de BAP formaram-se vários PLBs na periferia dos discos (Figura 1.5E-M). Também foi possível observar novos PLBs laterais desenvolvendo-se nesses PLBs (Figura 1.5L). O PLB apresenta formato esférico com uma região apical contendo primórdios foliares e uma região oposta com pelos absorventes (Figura 1.6A). Poucos estômatos foram visualizados na superfície do PLB (Figura 1.6B).

O PLB em secção transversal, no momento da instalação do experimento, apresenta formato arredondado. A epiderme é unisseriada, com células alongadas no sentido transversal, e com poucos estômatos e tricomas dispersos. Nas camadas subepidérmicas ocorrem idioblastos com ráfides. O tecido de preenchimento é parenquimático com células de diferentes tamanhos e formatos, e na região central ocorre um cilindro vascular envolvido pela endoderme (Figura 1.6C). O xilema e o floema possuem organização de região de transição entre o caule a raiz. Em secção longitudinal, observa-se na região apical um meristema caulinar com primórdios foliares envolvidos por uma estrutura inicialmente contínua com epiderme interna e externa, mesofilo parenquimático e feixes vasculares, similar ao coleóptile de embriões zigóticos (Figura 1.6D). Pela similaridade desta com o coleóptile de embriões zigóticos será definida como tal no presente trabalho.

Os discos de PLBs aos nove dias em meio de cultura sem a adição de fitorregulador não apresentam alterações visíveis (Figura 1.6E). Já aos 12 dias,

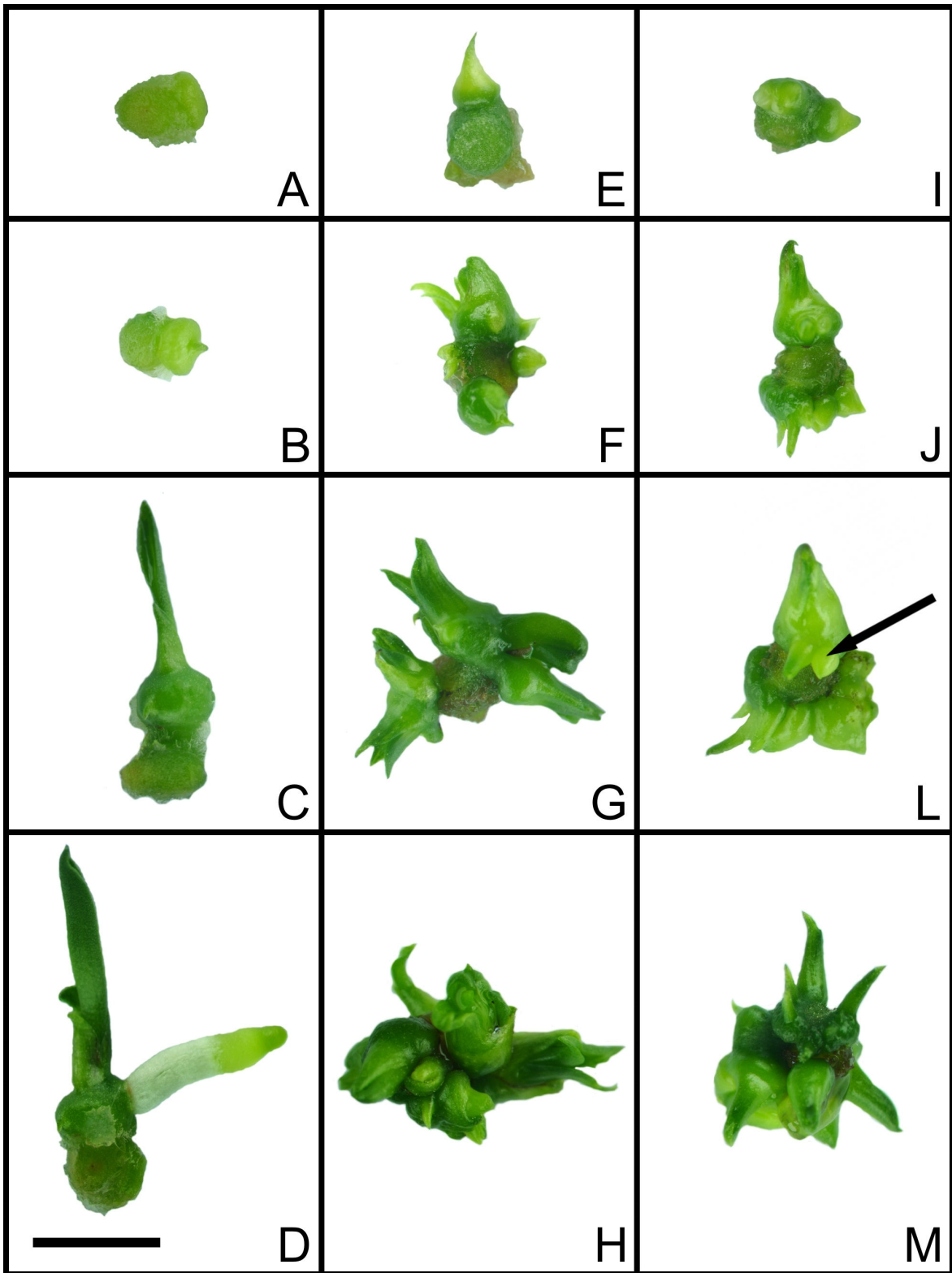


FIGURA 1.5 – Discos de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-D. Em meio de cultura sem fitorregulador; E-H. Em meio de cultura adicionado de 10 μ M de BAP; I-M. Em meio de cultura adicionado de 20 μ M de BAP. A, E e I. 21 dias de cultura; B, F e J. 30 dias de cultura; C, G e L. 45 dias de cultura; D, H e M. 60 dias de cultura; seta = PLBs laterais. Barra = 0,5 cm.

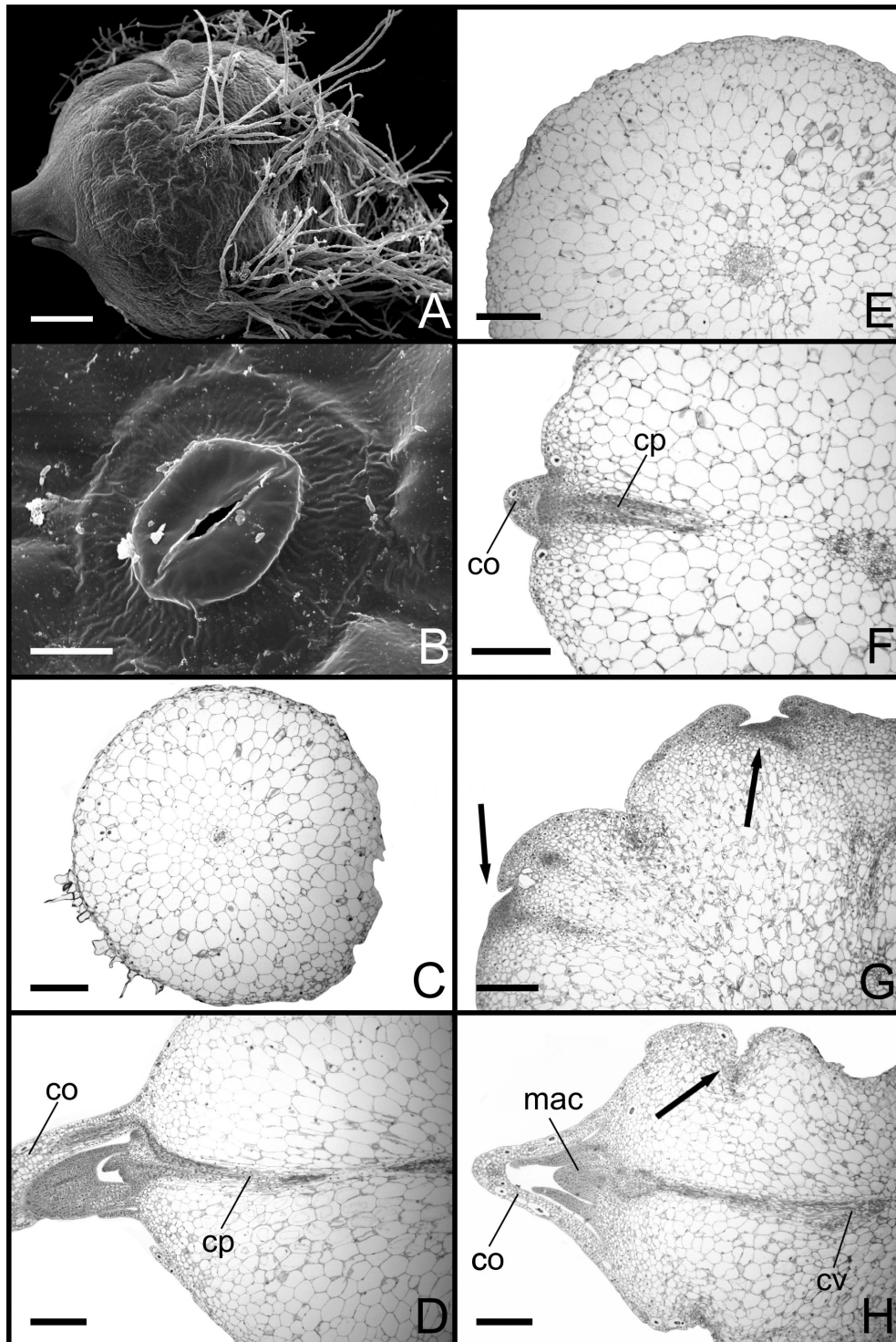


FIGURA 1.6 - PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. PLBs em vista geral (MEV); B. detalhe de um estômato na superfície do PLB (MEV); C. Secção transversal do PLB no dia zero; D. Secção longitudinal do PLB no dia zero, observar o meristema apical envolvido pelo coleóptile; E-H. PLBs cultivados em meio de cultura sem a adição de BAP; E. Secção do PLB aos nove dias de cultura; F. Secção do PLB aos 12 dias de cultura, observar a origem de ápices meristemáticos; G. Secção do PLB aos 21 dias de cultura, observar dois ápices meristemáticos (setas); H. Secção do PLB aos 30 dias de cultura, verificar o início do estrangulamento na base do novo PLB formado (seta). co = coleóptile. cp = cordão procambial. cv = conexão vascular. mac = meristema apical caulinar. Barra A= 500 μm . Barra B= 10 μm . Barra C-H= 400 μm .

pode-se observar a formação de meristemas apicais caulinares, protegido pelo coleóptile, e conectado vascularmente ao tecido de origem (Figura 1.6F). Aos 21 dias de cultura, esses meristemas se desenvolvem dando origem a primórdios foliares e tecido parenquimático, aumentando de volume (Figura 1.6G). Esses meristemas apicais originam novos PLBs que são observados aos 30 dias de cultura. Os novos PLBs apresentam região apical desenvolvida e conexão vascular com o disco. Neste estágio de desenvolvimento, é possível observar o estrangulamento na base desses PLBs, devido ao surgimento de uma zona de abscisão (Figura 1.6H). Após ocorrer o total desligamento dos PLBs com o tecido de origem, eles se desprendem facilmente.

Os discos de PLBs, aos nove dias em meio de cultura com 10 μ M de BAP, apresentam protuberâncias formadas pela divisão celular da epiderme e camadas subepidérmicas (Figura 1.7A). As células dessas protuberâncias assumem características de células meristemáticas, como núcleo evidente, conteúdo denso e pouco vacuoladas. Aos 12 dias, já é possível observar a individualização do coleóptile, ainda contínuo, protegendo o meristema caulinar apical e a conexão vascular com o disco de PLB (Figura 1.7B). O novo PLB está desenvolvido aos 21 dias e iniciando o desligamento com o tecido de origem (Figura 1.7C). Nesse estágio de desenvolvimento, é possível observar o rompimento do coleóptile devido ao desenvolvimento do meristema apical do PLB. Com 30 dias de cultura, os novos PLBs formados apresentam região apical com folhas bem desenvolvidas. Além disso, também é observado o surgimento de PLBs laterais (Figura 1.7D).

No tratamento com 20 μ M de BAP, a epiderme, aos nove dias de cultura, torna-se meristemática em quase todo o contorno do explante (Figura 1.7E). Aos 12 dias, a camada meristemática torna-se mais espessa e inicia-se a formação de protuberâncias (Figura 1.7F). Essas protuberâncias iniciam o desenvolvimento do meristema apical caulinar aos 21 dias (Figura 1.7G). Com 30 dias de cultura, os PLBs têm região apical diferenciada com várias folhas (Figura 1.7H). Da mesma forma que os discos de PLBs cultivados em meio de cultura sem fitorregulador, forma-se uma zona de abscisão na base dos novos PLBs, isolando-os do disco central (Figura 1.7I). Nessa região foi possível distinguir duas camadas distintas, uma com células pequenas de parede delgada e com poucos espaços intercelulares, e outra com a presença de suberina.

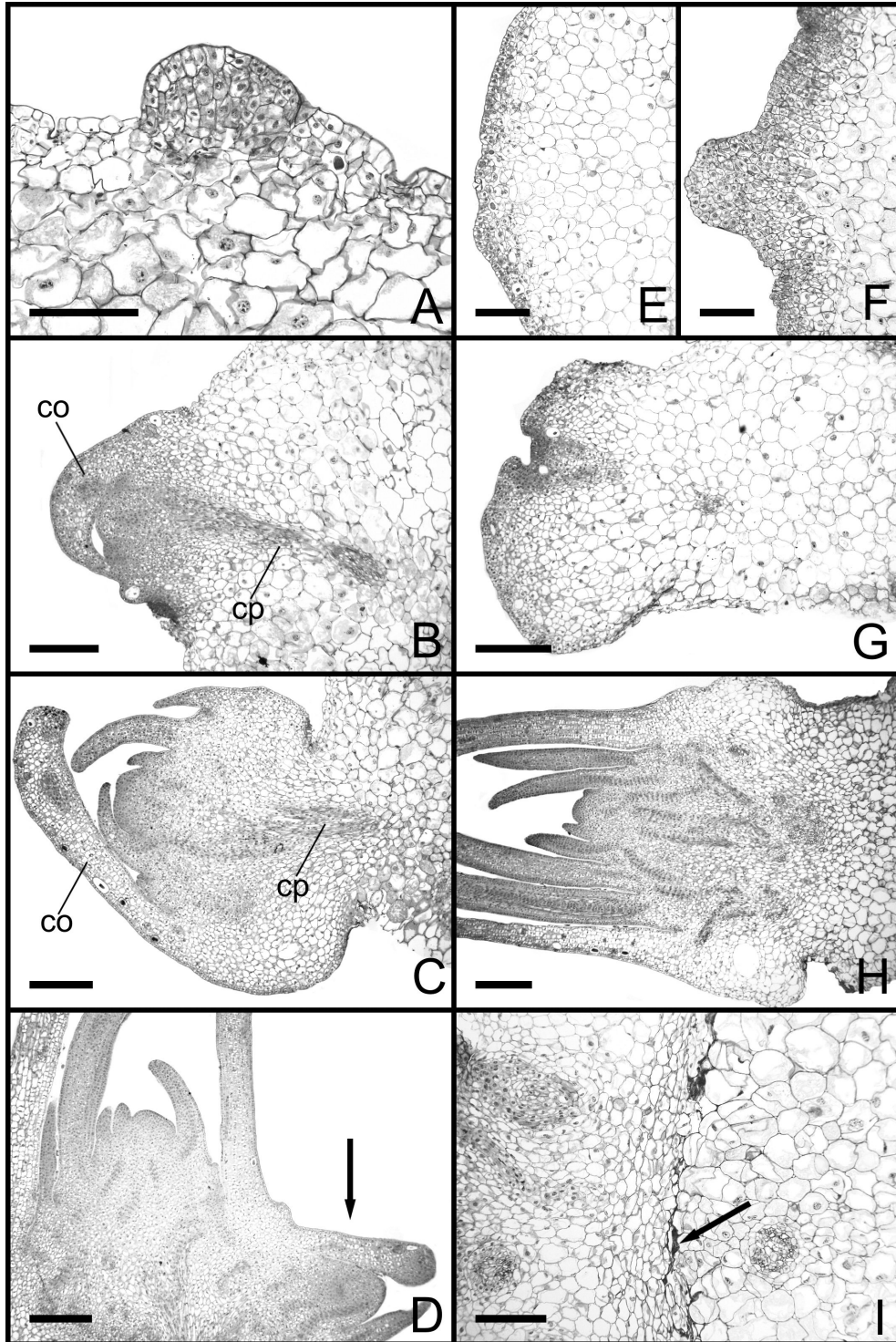


FIGURA 1.7 - Secções de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-D. cultivados em meio de cultura adicionado de 10 μ M de BAP. E-I cultivados em meio de cultura adicionado de 20 μ M de BAP. A,E Secção do PLB aos nove dias de cultura; B,F. Secção do PLB aos 12 dias de cultura; C,G. Secção do PLB aos 21 dias de cultura; D,H-I. Secção do PLB aos 30 dias de cultura, observar um PLB lateral (seta). I. Detalhe da zona de abscisão (seta). co = coleóptile. cp = cordão procambial. Barra A, E, F e I= 200 μ m. Barra B-D, G e H= 400 μ m.

2.4 DISCUSSÃO

A micropropagação de orquídeas utilizando discos de PLBs, tanto com cortes transversais (TENG et al., 1997; ISHII et al., 1998; YOUNG et al., 2000; NAYAK et al., 2002) como foi testada para *Cymbidium* no presente trabalho, como com cortes longitudinais (BEGUM et al., 1994; HUAN et al., 2004; HUAN e TANAKA, 2004), obteve resultados satisfatórios nos últimos anos. NAYAK et al. (2002) indicam que esses resultados positivos estão relacionados com a alta capacidade de regeneração desse tecido, e ainda que essa técnica tem a vantagem de economia de tempo e de material. Os mesmos autores observaram que a adição de citocinina no meio de cultura é essencial para elevar a porcentagem de explantes regenerando PLBs, bem como aumentar o número de PLBs por disco. E ainda, utilizando secções transversais de PLBs de *Cymbidium aloifolium* (Orchidaceae), obtiveram as maiores porcentagens de explantes regenerando novos PLBs (68,03%) e número de PLBs por disco (28,1) utilizando 22 µM de BAP. Resultado semelhante ao obtido no presente trabalho, no qual a melhor concentração para a formação de PLBs foi de 20 µM.

No entanto, BEGUM et al. (1994) obtiveram um número maior de PLBs por explante (8,3) utilizando 4,4 µM de BAP para discos de PLBs de *Cymbidium x Thanksgiving 'Nativity'* (Orchidaceae). Ainda segundo esses autores, as respostas dos explantes ao tipo e concentrações de fitorreguladores podem variar de acordo com o cultivar. O tratamento sem a adição de BAP regenerou novos PLBs, segundo BEGUM et al. (1994), sugerindo que a adição de fitorreguladores não é essencial para a formação direta de PLBs no explante.

A elevação da concentração de BAP inibiu a formação de raízes nos PLBs, os quais desenvolveram somente a parte aérea. SEENI e LATHA (1992) também observaram que a presença de altas concentrações de BAP no meio de cultura inibiam o enraizamento de *Renanthera imschootiana* (Orchidaceae). Além disso, o aumento na concentração de BAP acima do nível ideal, ocasionou à inibição do desenvolvimento de novos PLBs, confirmando o observado por NAYAK et al. (2002).

ROY e BANERJEE (2003), estudando *Dendrobium fimbriatum* (Orchidaceae), da mesma forma que nesse trabalho, observaram a necessidade de transferir os

PLBs para o meio de cultura sem fitorregulador para que estes se desenvolvessem em plantas.

Em monocotiledôneas, o embrião zigótico passa pelos estádios globular e coleoptilar (GRAY e PUROHIT, 1991). No entanto, em orquídeas, após a germinação da semente, o embrião desenvolve-se formando uma estrutura denominada protocormo, o qual apresenta uma natureza hipocotílica (FONT QUER, 1989). Os embriões zigóticos de orquídeas, protocormo, apresentam características que contrariam o descrito para a maioria das angiospermas, pois não são estruturas bipolares. De acordo com BELTRATI e PAOLI (2003), nas monocotiledôneas mais avançadas como as orquídeas, a raiz primária é pouco desenvolvida ou ausente. JIMÉNEZ (2001) descreve a embriogênese somática como um processo no qual células haplóides ou diplóides se desenvolvem em estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, os quais são estruturas bipolares sem conexão vascular com o tecido de origem (ARNOLD et al., 2002). O processo de embriogênese somática direta ou indireta em orquídeas está baseado na formação de PLBs (ARDITTI e ERNST, 1993; BEGUM et al., 1994). A embriogênese direta seria a diferenciação direta do explante em PLBs, que por sua vez formarão novas plantas.

No presente trabalho, os discos de PLBs desenvolveram diretamente novos PLBs, pela proliferação das células epidérmicas e subepidérmicas, tanto nos meios de cultura sem fitorregulador como nos adicionados de BAP. Esses PLBs, da mesma forma que no descrito para os protocormos, não são estruturas bipolares. A presença de uma folha contínua protegendo o meristema apical caulinar também foi observada nos diferentes tratamentos, sendo denominada, no presente trabalho, de coleóptile devido à semelhança com o coleóptile presente em embriões de gramínea.

No presente estudo foi observado que, primeiramente, durante o desenvolvimento dos novos PLBs, há conexão com o tecido de origem, e que essa conexão é posteriormente rompida pela formação de uma zona de abscisão. Esse resultado difere do normalmente observado na embriogênese somática, a qual é caracterizada por não apresentar conexão vascular do embrião com o tecido de origem (ARNOLD et al., 2002). As características da zona de abscisão observada nos PLBs conferem com o descrito para a zona de abscisão de folhas em Gimnospermas e Dicotiledôneas, por vários autores (WEIER et al, 1982; CUTTER,

1987; MAUSETH, 1988). Ainda segundo esses autores, a primeira camada com células pequenas é denominada de camada de separação e a que contém suberina de camada protetora.

BEGUM et al. (1994), utilizando como explante secções longitudinais de PLBs de *Cymbidium*, observaram que a regeneração dos novos PLBs foi a partir da proliferação de pequenos grupos de células epidérmicas, as quais apresentavam, da mesma forma que nesse estudo, citoplasma denso, pouco vacuolado e com núcleo evidente. Esses autores observaram que, aos 28 dias de cultivo, os novos PLBs formados apresentavam primórdios foliares e cordão procambial. Porém, não verificaram a presença de uma folha contínua protegendo o meristema apical caulinar e nem a presença da conexão vascular com o tecido de origem, como foi observado nesse trabalho.

A embriogênese somática direta foi observada em folhas de *Oncidium Gower Ramsey* (Orchidaceae), nas quais os embriões foram geralmente formados das células das camadas epidérmica e subepidérmicas (CHEN et al., 1999). No entanto, diferentemente do observado em *Cymbidium*, os autores afirmam que a origem dos embriões é a partir de uma única célula. A origem direta dos PLBs em ápice de raiz de *Clowesia warscewiczii* (Orchidaceae) foi a partir da proliferação das células do meristema apical (KERBAUY e ESTELITA, 1996). No entanto, em ápice de raiz de *Doritaenopsis 'New Candy'* (Orchidaceae), foi observada a embriogênese direta e indireta. A origem direta dos PLBs ocorreu pela proliferação das células do meristema apical; já a origem indireta ocorreu pela proliferação das células do córtex, as quais formaram uma massa de células semelhante a um calo (PARK et al., 2003).

Os discos de PLBs cultivados em meio de cultura adicionado de 10 e 20 μM de BAP, apresentaram diferenças no início do desenvolvimento dos novos PLBs. No meio de cultura contendo 10 μM de BAP, formaram-se protuberâncias localizadas na epiderme, já no meio de cultura contendo 20 μM de BAP, a epiderme e as camadas subepidérmicas, em quase todo o contorno do explante, tornaram-se meristemáticas. Essa diferença anatômica reflete no maior número médio de novos PLBs (9,95) no meio de cultura contendo 20 μM de BAP.

2.5 CONCLUSÃO

A técnica utilizada mostrou-se eficiente devido à capacidade dos discos de PLBs regenerarem diretamente novos PLBs e subsequentemente formarem plantas. Portanto, essa técnica pode ser utilizada para a multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis' em larga escala, sendo a concentração de 20 μM de BAP a mais indicada para a regeneração dos discos de PLBs. Cada PLB pode dar origem a 20 plantas em quatro meses. Pelas análises anatômicas os PLBs são originados diretamente das células das camadas epidérmica e subepidérmicas, possuem uma folha (coleóptile) protegendo o meristema apical caulinar e conexão vascular com o tecido de origem. A separação do PLB do disco de origem ocorre a partir da instalação de uma zona de abscisão.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.
- ARNOLD, S. von; SABALA, I.; BOZHKOVA, P.; DYACHOK, J.; FILOLOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 69, p. 233-249, 2002.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D.; Sur la nature des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae). **Comptes Rendus de l' Académie des Sciences**, Paris, t. 316, Série III, p. 139-144, 1993.
- BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, v. 63(3), p. 663-673, 1994.
- BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Semente. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. Capítulo 15, p. 399-424.
- CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 143-149, 1999.
- CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal: Parte II – Órgãos experimentos e interpretações**. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.
- DRESSLER, L. R. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314 p.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P.. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FONT QUER, P. **Diccionario de Botânica**. Barcelona: Editorial Labor, 1989.
- GRAY, D. J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 33-61, 1991.
- HARRISON, C.; ARDITTI, J.; Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, v. 139(2), p. 180-189, 1978.
- HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M.; Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, v. 166, p. 1443-1449, 2004.

HUAN, L. V. T.; TANAKA, M. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 79(3), p. 406-410, 2004.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T. GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 446-450, 1998.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13(2), p. 196-223, 2001.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. MacGraw-Hill Book Co, New York. 1940.

KERBAUY, G. B; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8 (2), p. 157-159, 1996.

LEROUX, G.; DENIS, B.; VIETH, J. Morphogenesis of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 73, p. 53-72, 1997.

MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1988.

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

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 107-116, 2002.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v. 164, p. 919-923, 2003.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. f. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 333-340, 2003.

SEENI, S.; LATHA, P. G. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 167-172, 1992.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L.; TENG, M. C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 831-835, 1997.

YOUNG, P. S.; MURTHY, H. N.; YOEU, P. K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 67-72, 2000.

WEIER, T. E.; STOCKING, C. R.; BARBOUR, M. G.; ROST, T. L. **Botany: an introduction to plant biology**. United States of America: John Wiley & Sons, 1982. 720p.

CAPÍTULO II

Efeito de ANA e BAP na regeneração e na morfo-anatomia de *Cymbidium* 'Joy Polis' a partir de discos de PLBs

RESUMO

O gênero *Cymbidium* Hort., pertencente à família Orchidaceae, é constituído por um grupo numeroso de espécies e plantas híbridas importantes economicamente como plantas ornamentais. Os métodos convencionais de propagação vegetativa pela divisão de touceiras são extremamente lentos. Portanto, técnicas de propagação *in vitro* que possibilitem e acelerem a produção de mudas, são essenciais para a horticultura. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de discos de PLBs utilizando diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) isolado ou combinado ao 6-benzilaminopurina (BAP). PLBs, oriundos dos meristemas de gemas axilares de *Cymbidium* 'Joy Polis', foram seccionados transversalmente, dando origem a dois discos de 0,7 a 1,0 mm de espessura e 0,3 a 0,4 cm de diâmetro. Em seguida foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com ANA isolado ou combinado a 0,5 μM de BAP nas seguintes concentrações: 0,5; 1; 2 e 4 μM . Esse experimento foi realizado duas vezes, sendo uma cultura mantida sob iluminação (fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a outra mantida 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação. As avaliações foram realizadas após 90 dias, sendo consideradas as seguintes variáveis: número médio de PLBs e plantas formadas por disco, altura das plantas e porcentagem de explantes necróticos. A origem dos PLBs foi direta pela proliferação das células das camadas epidérmica e subepidérmicas. Nos explantes que foram cultivados no escuro, em quase todo o contorno do disco de PLB foram observadas células assumindo atividade meristemática resultando num número maior de PLBs formados. Os tratamentos com ANA combinado ao BAP deram resultados estatisticamente superiores aos tratamentos com ANA isolado. O tratamento com 0,5 μM de ANA combinado a 0,5 μM de BAP forneceu o maior número médio de PLBs por disco tanto no tratamento sob iluminação (3,25) quanto no escuro (7,03). Em ambos os experimentos houve um aumento na porcentagem de explantes necróticos com o aumento na concentração de ANA, tanto nos tratamentos sem BAP como na presença de BAP. Portanto, o tratamento mais indicado é o de 0,5 μM de ANA combinado a 0,5 μM de BAP mantido 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação.

Palavras chave: Orchidaceae, micropropagação, fitorregulador

ABSTRACT

The *Cymbidium* Hort. genus, Orchidaceae family, has numerous species and hybrids, which are economically important as ornamental plants. The traditional vegetative propagation method by plant shoot separation is slow. In vitro propagation techniques that make possible and speed up the plant production are thus essential for horticulture. The objective of this study was to develop an efficient protocol for PLBs sections using naphthaleneacetic acid (NAA) alone or combined with N⁶-benzyladenine (BA). PLBs originated from meristems of axillary buds of *Cymbidium* 'Joy Polis', were cut transversally, forming two thin sections, 0.7 to 1 mm thick and with 0.3 to 0.4 cm of diameter, that were inoculated in MS culture medium supplemented with NAA (0,5; 1; 2 e 4 µM), alone or combined with 0.5 µM BA. This experiment was made twice: one of them was developed under 16 h photoperiod (irradiance de 40 µmol.m⁻².s⁻¹) and the other was kept for 30 days in dark and 60 days under illumination. After 90 days, the following variables were analyzed: the number of PLBs and plants formed per section, the plant height up to 0.5 cm and the necrotic explants percentage. The PLBs were originated directly by proliferation of cells of the epidermal and subepidermal layers. In the explants cultivated in dark conditions, almost in all the periphery of the PLBs, cells with meristematic activity were observed, resulting in a higher number of PLBs formed. The treatment with NAA combined with BA showed statistically superior results than treatment with NAA only. The treatment with 0.5 µM NAA plus 0.5 µM BA showed the biggest PLBs mean number both under light condition (3.25) and darkness (7.03). In both experiments, the percentage of necrotic explants increased with the increase of NAA concentration, with or without BA. The most efficient treatment was the combination of 0.5 µM NAA and 0.5 µM BA kept 30 days in darkness and 60 days under illumination.

Key words: Orchidaceae, micropropagation, growth regulator

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção de mudas de orquídeas é feita principalmente pela germinação de sementes *in vitro*. Porém, uma grande desvantagem dessa técnica é a variabilidade genética, devido à alta heterogeneidade das mudas produzidas. Essa desvantagem é agravada pela demora na floração das mudas produzidas, em torno de 5 a 7 anos. Portanto, somente após esse período o produtor poderá selecionar as melhores flores. Uma solução para esse problema é a cultura de tecidos *in vitro*, a qual possibilita a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente. Para essa técnica podem ser utilizados diferentes explantes, como meristemas, gemas dormentes, pedaços de folhas e raízes e mais recentemente discos de PLBs.

O processo de embriogênese somática direta ou indireta em orquídeas está baseado na formação de PLBs (STEWART e MAPES, 1971; ARDITTI e ERNST, 1993; BEGUM et al., 1994). A embriogênese direta seria a diferenciação direta do explante em PLBs, que por sua vez formarão novas plantas. Já na embriogênese indireta ocorre uma fase intermediária de calo, antes da formação dos PLBs (STEWART e MAPES, 1971; BEGUM et al., 1994; LAKSHMANAN et al., 1996; ISHII et al., 1998; HUAN e TANAKA, 2004).

A formação de embriões globulares bem definidos não tem sido descrita na embriogênese somática para a família Orchidaceae (CHANG e CHANG, 1998). A embriogênese somática direta foi observada em folhas de *Oncidium* 'Gower Ramsey' (Orchidaceae), nas quais os embriões formavam-se a partir da epiderme e da camada subepidérmica (CHEN et al. 1999). Em ápices de raiz de *Doritaenopsis* (Orchidaceae), PLBs originam-se diretamente da região meristemática e indiretamente da região do córtex (PARK et al., 2003). Já KERBAUY e ESTELITA (1996) observaram somente a formação direta de PLBs no ápice meristemático de *Clowesia warscewiczii* (Orchidaceae).

Pesquisas de embriogênese indireta em orquídeas são escassas, principalmente as que utilizam PLBs como explantes (HUAN et al., 2004). Esse fato pode ser devido ao crescimento lento e tendência necrótica dos calos de orquídeas (KERBAUY, 1984). BEGUM et al. (1994) observaram que calos de *Cymbidium*

sofriam necrose após dois meses de cultura. A formação de calos em orquídeas depende fundamentalmente da concentração dos fitorreguladores utilizada (CHEN e CHANG, 2000; ROY e BANERJEE, 2003; HUAN et al., 2004). As maiores porcentagens de formação de calos foram obtidas, em diferentes explantes, com a combinação de auxinas, ANA e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), com a citocinina BAP (CHANG e CHANG, 1998; ISHII et al., 1998; CHEN e CHANG, 2000; ROY e BANERJEE, 2003; HUAN et al., 2004). O tempo de indução para a formação dos calos pode variar de um mês a 18 meses, dependendo da espécie, do tipo de explante, do meio de cultura e das condições de cultivo (HUAN et al., 2004). Segundo ROY e BANERJEE (2003), as plantas regeneradas dos calos podem ser tratadas como microestacas para o enraizamento ou como explantes para experimento de multiplicação.

A embriogênese somática apresenta vantagens especialmente para estudos de mutação espontânea ou induzida, bem como para transformação genética. A inserção de genes de resistência a doenças e estresse, de precocidade de florescimento e de melhoramento da morfologia e coloração é de grande importância comercial. A técnica de embriogênese somática tem sido pouco explorada para orquídeas (CHEN et al., 1999). Existem trabalhos com *Oncidium* (CHEN et al., 1999; CHEN e CHANG, 2000; CHEN e CHANG, 2002), *Cymbidium* (CHANG e CHANG, 1998, HUAN et al., 2004; HUAN e TANAKA, 2004) e *Phalaenopsis* (ISHII et al., 1998).

Apesar de existirem várias pesquisas com a indução de PLBs em culturas *in vitro* de orquídeas, sabe-se pouco sobre desenvolvimento estrutural desses PLBs e da sua origem nos diferentes explantes (PARK et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de plantas utilizando discos de PLBs em diferentes concentrações de ANA isolado ou combinado com BAP, acompanhando as alterações morfológicas e histológicas durante a regeneração dos PLBs.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal e a análise anatômica no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As lâmpadas utilizadas foram do tipo luz branca da marca Philips® 32W/64RS, as quais ficavam a uma distância de 40 cm dos frascos. Os frascos utilizados para o experimentos possuíam três centímetros de diâmetro e sete centímetros de altura, capacidade de 55 ml, e continham 10ml de meio de cultura. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®), com pH ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl a 0,1 N, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.2.2 Origem do material vegetal

Foram coletadas brotações laterais de 5 a 7 cm de comprimento de híbridos de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Estas foram fornecidas pela RF Orquídeas situada em Campo Largo, Paraná.

As brotações laterais do gênero *Cymbidium* foram desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos, e em seguida em hipoclorito de sódio a 2% com Tween 20 a 0,1% por 15 minutos. Posteriormente, foram feitas lavagens em água destilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico e com pinças e bisturis foram expostas as gemas e isolada a região meristemática com dois primórdios foliares adjacentes. Os meristemas foram cultivados em meio MS sem a adição de

fitorreguladores. Inicialmente ficaram 15 dias no escuro e posteriormente sob fotoperíodo de 16 horas. Foram utilizados como fonte de explantes os PLBs formados a partir dos meristemas após 60 dias.

3.2.3 Regeneração de PLBs

Os PLBs oriundos dos meristemas foram seccionados transversalmente com o auxílio de microscópio estereoscópico, dando origem a dois discos de 0,7 a 1,0 mm de espessura e 0,3 a 0,4 cm de diâmetro. Em seguida, foram inoculados em meio de cultura MS com ANA (0,5; 1; 2 e 4 μM) isolado ou combinado com BAP (0,5 μM). Esse experimento foi realizado duas vezes, sendo uma cultura mantida sob iluminação e a outra mantida 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação.

As avaliações foram realizadas após 90 dias, sendo consideradas as seguintes variáveis: número médio de PLBs formados por disco, número médio de plantas, altura das plantas acima de 0,5 cm e porcentagem de explantes necróticos. Para cada experimento, escuro e claro, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo testados oito tratamentos, com um arranjo fatorial de duas concentrações de BAP (0 e 0,5 μM) em quatro concentrações de ANA (0,5; 1; 2 e 4 μM).

3.2.4 Análise anatômica

Para a análise anatômica qualitativa foram coletadas amostras de PLBs cultivados *in vitro*, com 0,5 μM de ANA combinado com 0,5 μM de BAP em condições de iluminação e no escuro, a cada três dias, as quais foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940). Essas amostras foram destinados à preparação de lâminas permanentes, sendo incluídos em meta-acrilatoglicol (historresina-Leica), segundo a técnica de FEDER e O'BRIEN (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação, e os cortes foram obtidos com 7 μm de espessura e corados com azul de toluidina (FEDER e O'BRIEN, 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte®). As fotomicrografias foram

realizadas em microscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P200® acoplada.

3.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância. Inicialmente, as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram as médias dos tratamentos testadas por meio do teste de F, enquanto que as que apresentaram heterogeneidade tiveram seus valores transformados para posterior análise. Quando os resultados das médias dos tratamentos foram diferentes estatisticamente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS

Analisando-se a variância dos dados do experimento mantido 90 dias sob iluminação verificou-se que a interação entre as concentrações de BAP e ANA foi estatisticamente significativa para as variáveis número médio de PLBs formados por disco e altura das plantas, indicando que os fatores não são independentes (Anexo 7).

Os tratamentos com 0,5 μM ANA combinado ou não com 0,5 μM BAP e 4 μM de ANA proporcionaram os melhores resultados para o número médio de PLBs formados por disco (Figura 2.1). Já para a variável altura das plantas, os resultados foram semelhantes para todos os tratamentos (Figura 2.2).

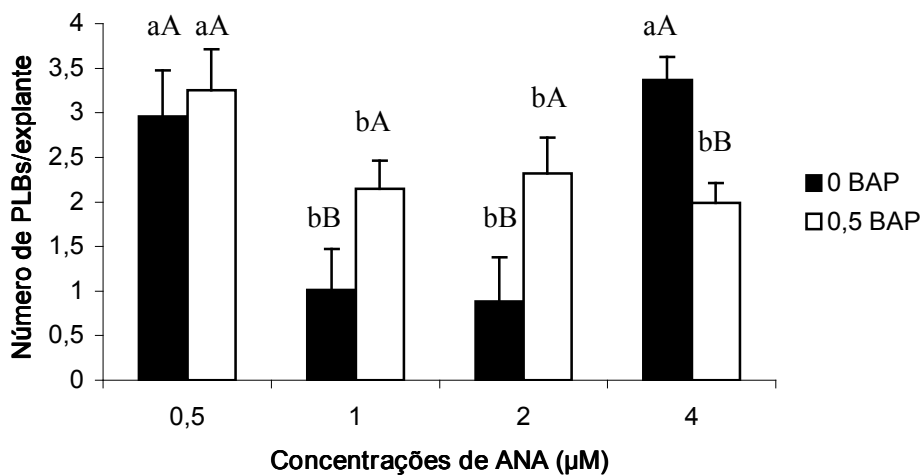


FIGURA 2.1 - Número de PLBs regenerados por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.

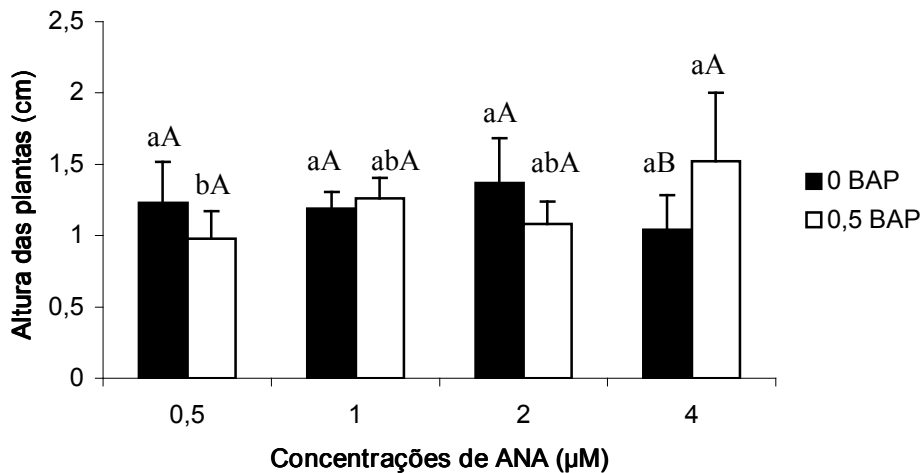


FIGURA 2.2 - Altura das plantas regeneradas por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.

Para as variáveis número médio de plantas por disco de PLB e porcentagem de explantes necróticos, foi evidenciado pela análise de variância que a interação entre as concentrações de BAP e ANA não foi significativa, indicando que os fatores são independentes (Anexo 7). Para a variável número médio de plantas por disco de PLB, somente o fator BAP foi significativo, essa não apresentando diferença estatística significativa entre as médias e resultando num valor médio de 1,65 para ambas as concentrações. Para a variável porcentagem de explantes necróticos, somente o fator ANA foi significativo, sendo o tratamento com $4 \mu\text{M}$ de ANA o que apresentou o pior resultado. A porcentagem de explantes necróticos apresentou uma tendência a crescer com o aumento na concentração de ANA (Figura 2.3).

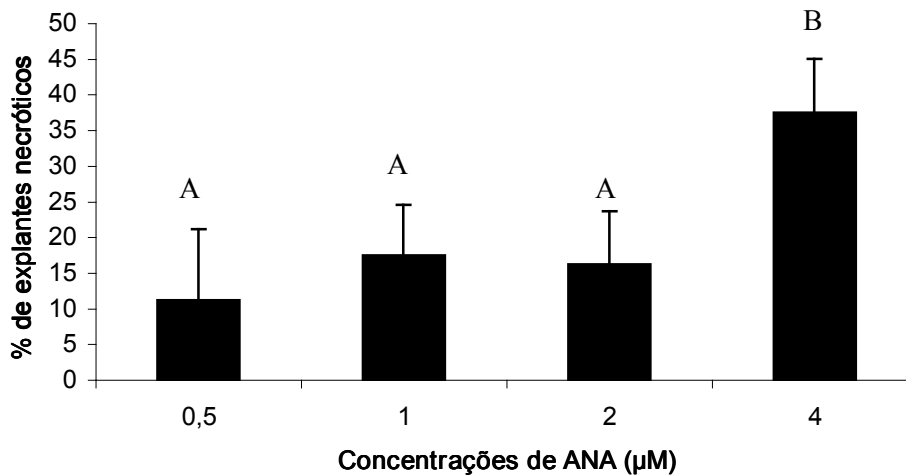


FIGURA 2.3 - Porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA após 90 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado ou não com BAP, pois esses tratamentos apresentaram os maiores valores de PLBs regenerados por disco e baixa porcentagem de explantes necróticos. A melhor multiplicação foi alcançada pelo tratamento com $0,5 \mu\text{M}$ ANA combinado a $0,5 \mu\text{M}$ BAP, principalmente quando considerada a soma dos números médios de PLBs e de plantas $5,35 (3,25 + 2,1)$. Nesse experimento, não foram observadas brotações sem raízes, somente PLBs ou a planta completa com parte aérea e raízes (Figura 2.4).

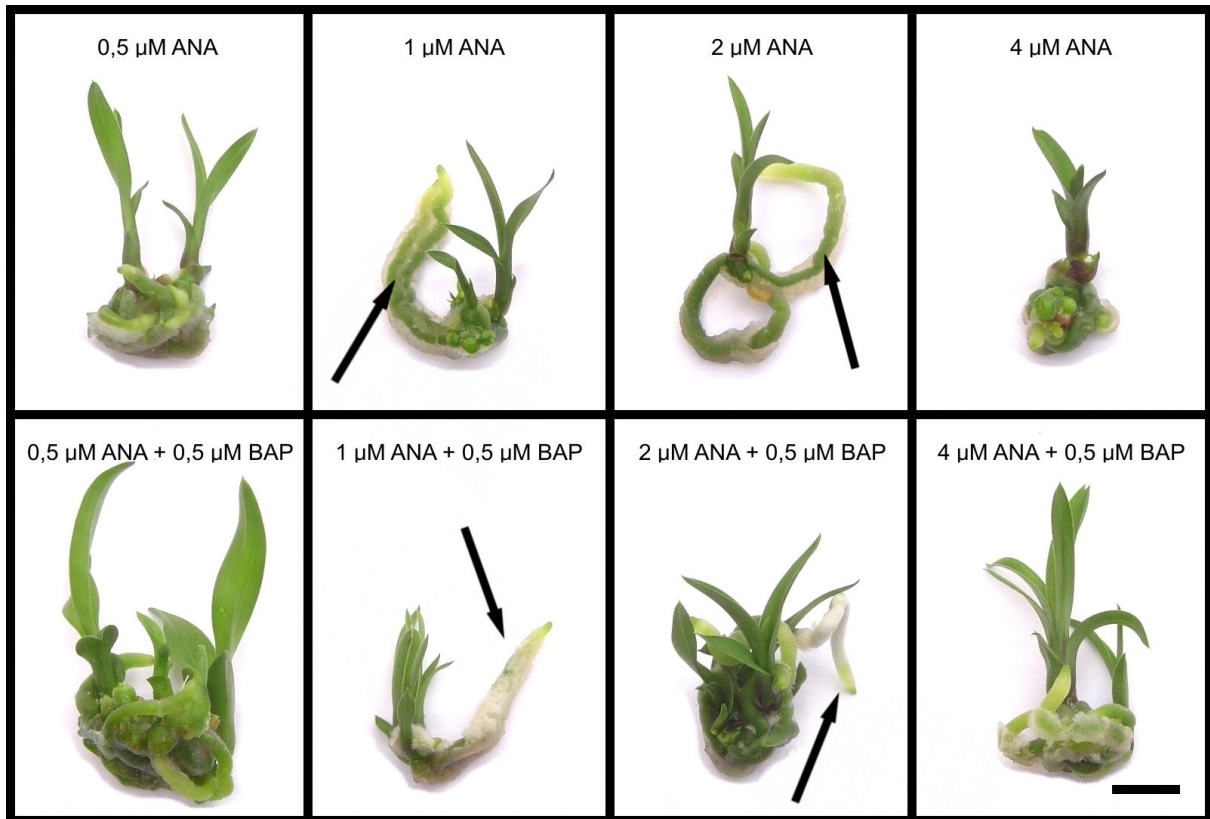


FIGURA 2.4 - Plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) após 90 dias. Seta = raiz. Barra = 1 cm.

A análise de variância dos dados do experimento mantido 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação revelou que a interação entre as concentrações de BAP e ANA foi significativa para as variáveis número médio de PLBs formados por disco, número médio de plantas e altura das plantas, indicando que os fatores não são independentes (Anexo 8).

Os explantes submetidos aos tratamentos com ANA combinado ou não com BAP apresentaram comportamentos diferentes com o aumento na concentração de ANA, os melhores resultados sendo obtidos com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP e $2 \mu\text{M}$ de ANA sem BAP (Figura 2.5). Já para a variável número médio de plantas por disco, os melhores resultados foram encontrados no tratamento com $2 \mu\text{M}$ de ANA combinada ou não com BAP (Figura 2.6).

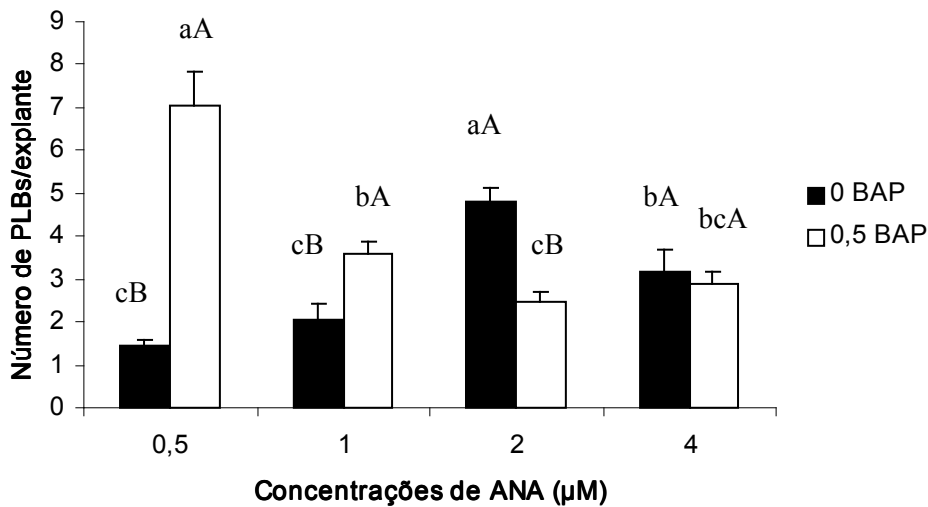


FIGURA 2.5 - Número de PLBs regenerados por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.

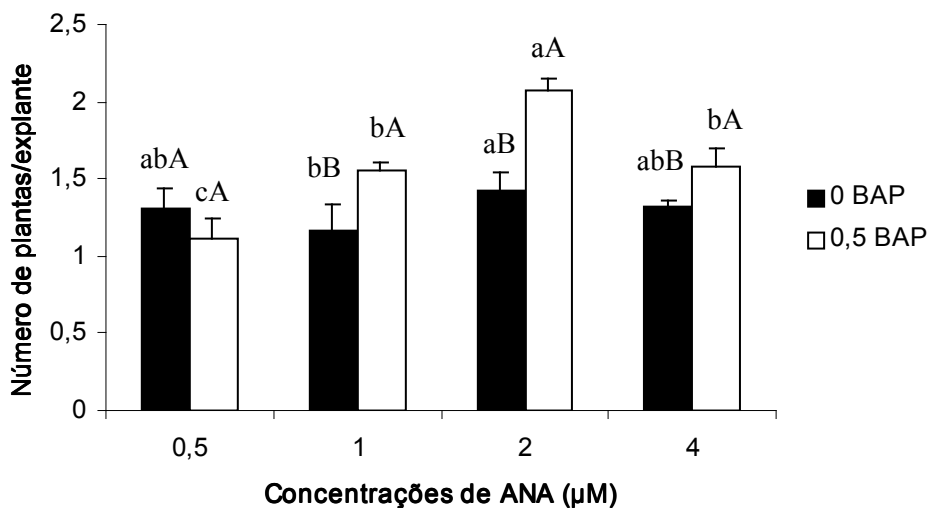


FIGURA 2.6 - Número de plantas regeneradas por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.

Para a variável altura das plantas, os melhores resultados para os tratamentos combinados a 0,5 μM de BAP, foram os com 0,5; 1 e 2 μM de ANA e para os tratamentos sem BAP foram os com 0,5 e 2 μM de ANA (Figura 2.7).

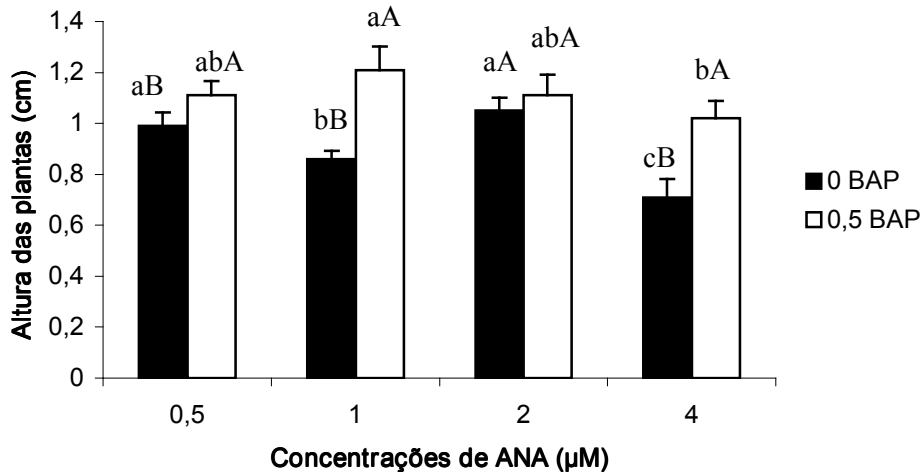


FIGURA 2.7 - Altura das plantas regeneradas por disco de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente para as concentrações de ANA e as letras maiúsculas para as concentrações de BAP ao nível de 95%.

Para a variável porcentagem de explantes necróticos, somente o fator ANA foi significativo (Anexo 8), sendo os tratamentos com 2 e 4 μM de ANA os que apresentaram os piores resultados. A porcentagem de explantes necróticos apresentou uma tendência a crescer com o aumento na concentração de ANA (Figura 2.8).

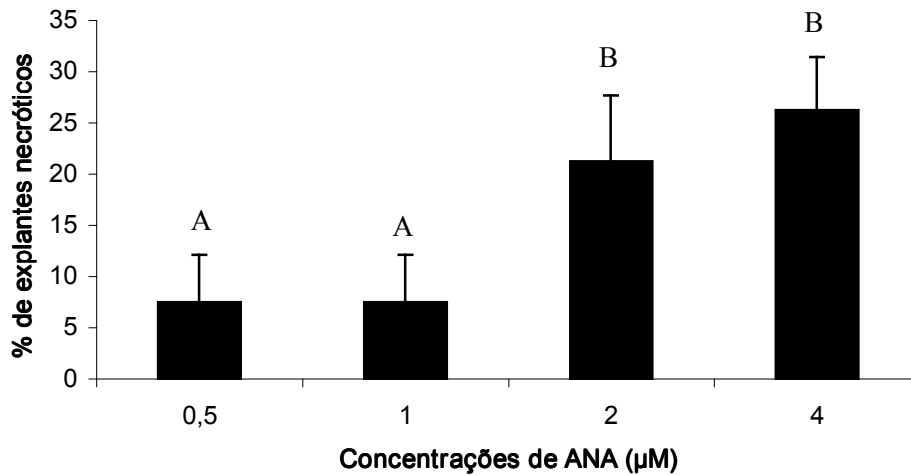


FIGURA 2.8 - Porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de ANA após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP, pois esse tratamento apresentou os maiores valores de PLBs regenerados por disco e baixa porcentagem de explantes necróticos (Figura 2.9). Além disso, nesse tratamento, a soma dos números médios de PLBs e de plantas chega a 8,14 ($7,03 + 1,11$).

Tanto na cultura mantida sob iluminação como na mantida 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação, os maiores números de PLBs regenerados por disco de PLB foram obtidos nos meios contendo $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado a $0,5 \mu\text{M}$ de BAP. Porém, a cultura mantida 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação resultou num maior valor do número de PLBs regenerados por disco que a cultura mantida 90 dias sob iluminação (7,03 e 3,25 respectivamente). Em ambos os experimentos houve um aumento na porcentagem de explantes necróticos com o aumento na concentração de ANA.

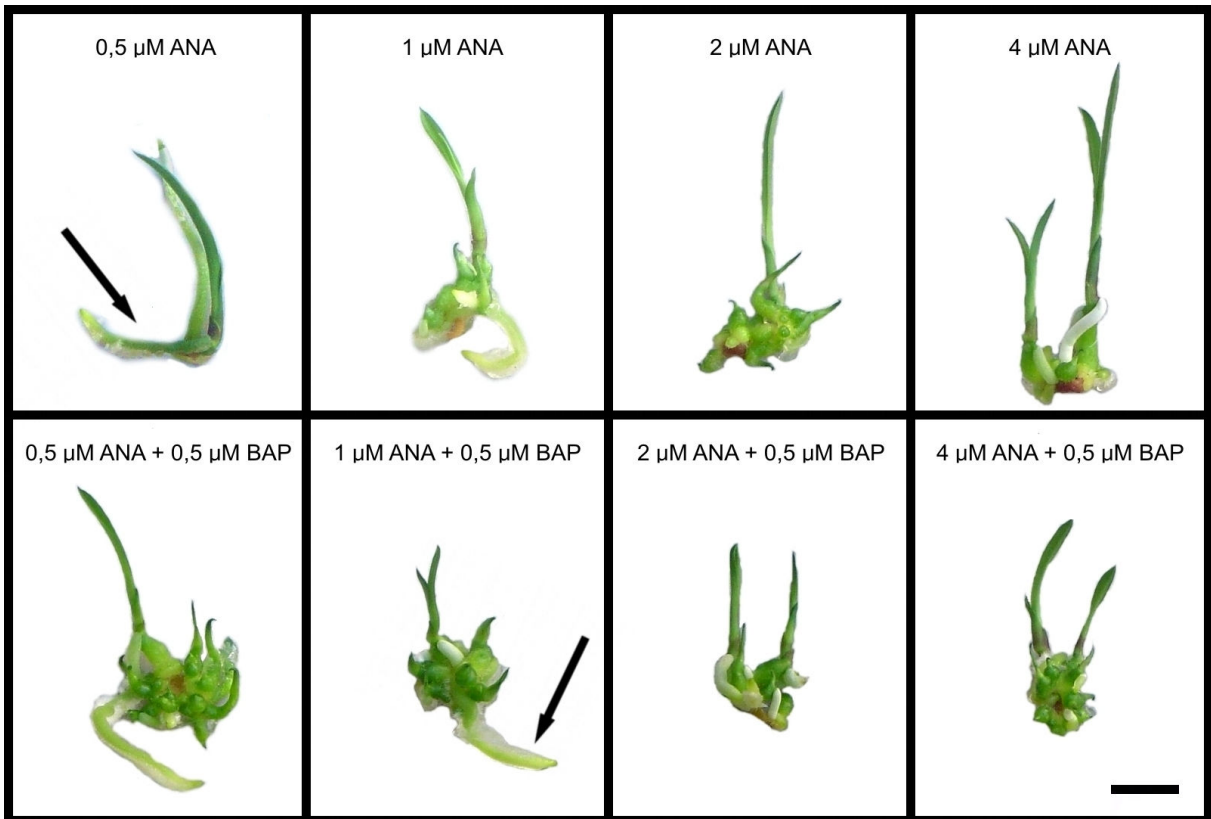


FIGURA 2.9 - Plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' obtidas a partir de discos de PLBs cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação (fotoperíodo 16 horas e irradiância de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) após 90 dias. Seta = raiz. Barra = 1 cm

Os discos de PLBs cultivados sob iluminação apresentaram novos PLBs formados aos 21 dias, e, aos 30 dias, esses PLBs possuíam região apical desenvolvida (Figura 2.10A-B). As primeiras raízes são observadas aos 45 dias de cultura (Figura 2.10C), e aos 60 dias, uma planta com folhas e raiz, além de novos PLBs, são visualizados (Figura 2.10D). Nos discos de PLBs cultivados no escuro, após 21 e 30 dias de cultura, formam-se PLBs aclorofilados e massas de células na periferia do disco (Figura 2.10E-F). Nos discos de PLBs, aos 45 e 60 dias, portanto a 15 e 30 dias sob iluminação, os PLBs tornam-se verdes e a massa de células dá origem a vários PLBs (Figura 2.10G-H).

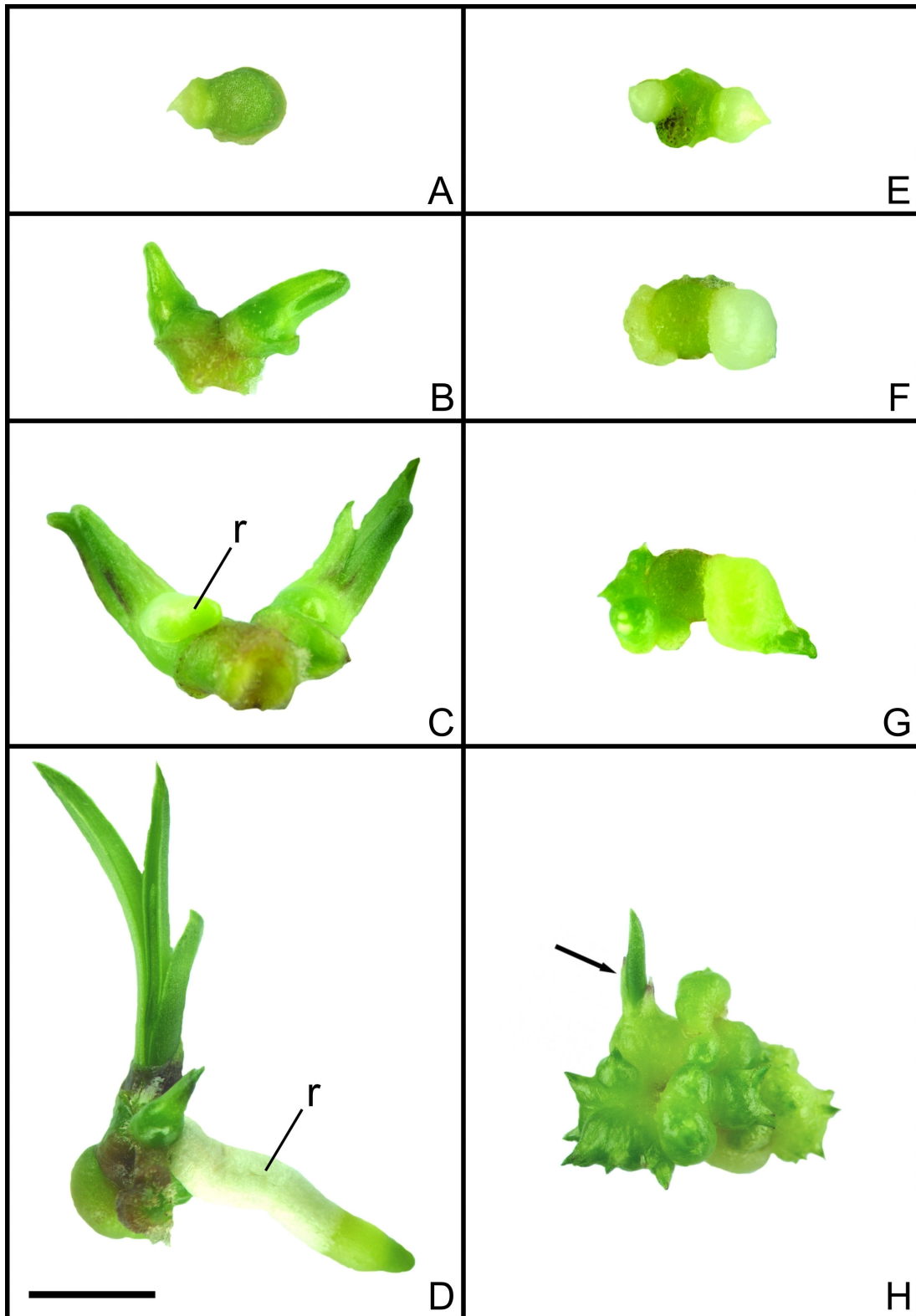


FIGURA 2.10 – Discos de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A-H. Discos de PLBs cultivados em meio de cultura adicionado de $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado a $0,5 \mu\text{M}$ de BAP; A-D cultivados sob iluminação; E-F. cultivados no escuro; G. sob iluminação a 15 dias; H. sob iluminação a 30 dias A. e E. 21 dias de cultura; B. e F. 30 dias de cultura; C. e G. 45 dias de cultura; D. e H. 60 dias de cultura. r = raiz. Seta = coleóptile. Barra = 0,5 cm.

Os discos de PLBs mantidos em meio de cultura com 0,5 μM de ANA combinado a 0,5 μM de BAP sob iluminação, aos nove dias de cultura apresentaram porções da epiderme e camadas subepidérmicas assumindo características meristemáticas (Figura 2.11A e B). Aos 12 dias já foi possível observar a formação de meristema apical caulinar protegido por uma folha com epiderme interna e externa, mesofilo parenquimático e feixes vasculares, similar ao coleóptile de embriões zigóticos (Figura 2.11C). Pela similaridade desta com o coleóptile de embriões zigóticos será definida como tal no presente trabalho. Com 21 dias, observou-se protuberância desenvolvida ao redor do disco de PLB (Figura 2.11D) e aos 30 dias essas protuberâncias já estão diferenciadas em novos PLBs que estão praticamente desconectados do tecido de origem (Figura 2.11E).

Os discos de PLB cultivados no mesmo meio de cultura citado anteriormente, porém no escuro, aos nove dias, apresentaram várias projeções de células meristemáticas próximas à epiderme (Figura 2.11F). Essas projeções aumentaram de volume aos 12 dias de cultura (Figura 2.11G). Aos 21 dias observou-se PLBs desenvolvidos com meristema apical caulinar protegido pelo coleóptile, e com um cordão procambial conectado ao disco central. Nesse estágio, o novo PLB inicia sua separação do disco original através de um estrangulamento na base (Figura 2.11H). Com 30 dias de cultura, os PLBs formados iniciaram um processo de estiolamento, tornando-se alongados (Figura 2.11I).

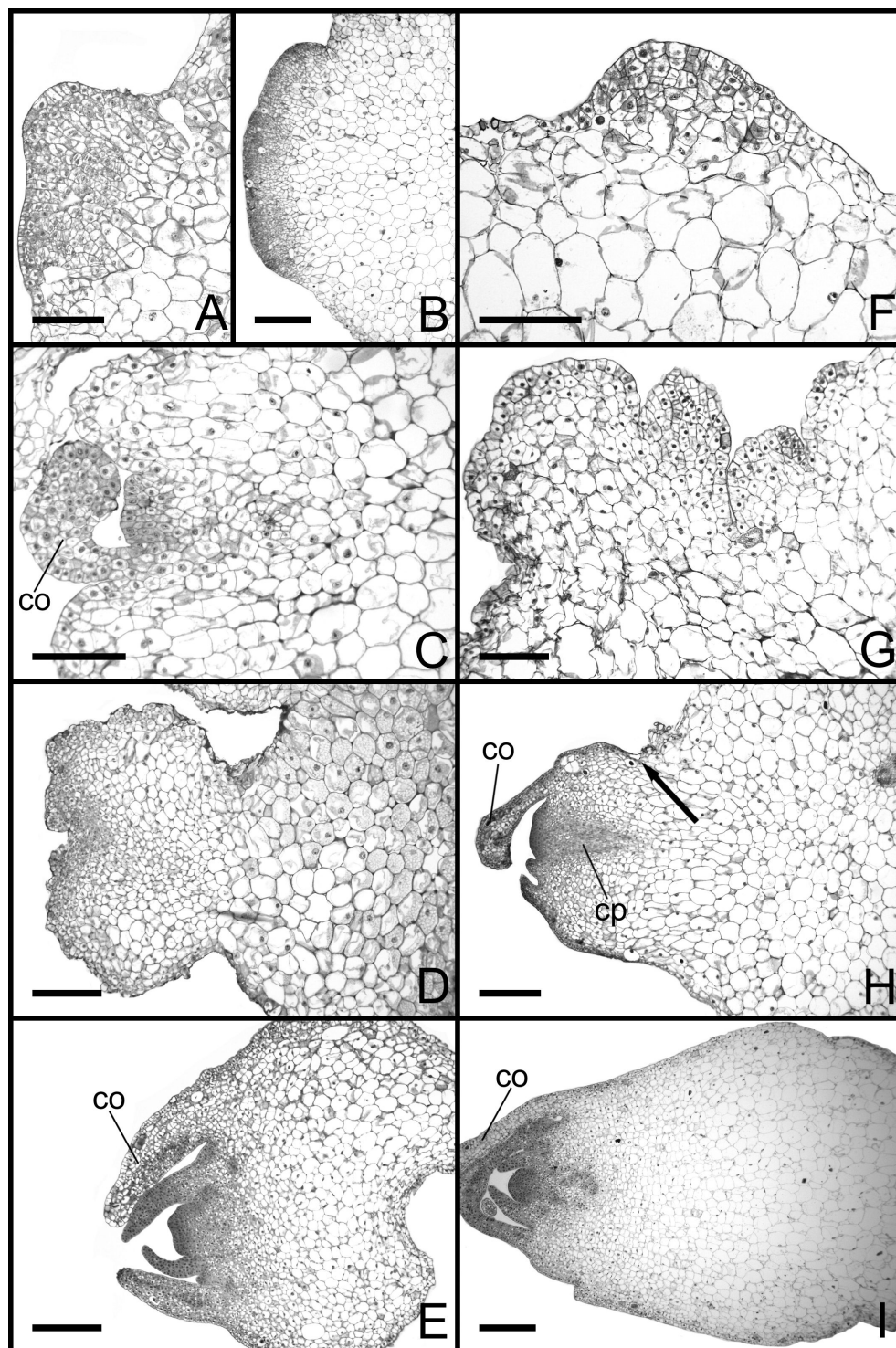


FIGURA 2.11 - Secções de PLBs de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura adicionado de $0,5 \mu\text{M}$ de ANA combinado a $0,5 \mu\text{M}$ de BAP. A-E. mantidas sob iluminação. F-I. mantidas no escuro. A-B, F. aos nove dias de cultura; C, G. aos 12 dias de cultura; D, H. aos 21 dias de cultura, observar o início do estrangulamento na base do novo PLB formado (seta); E-I. aos 30 dias de cultura. co = coleóptile. cp = cordão procambial. Barra A, C, F e G= $200 \mu\text{m}$. Barra B, D-E, I e H= $400 \mu\text{m}$.

3.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a adição de ANA no meio de cultura nas concentrações de 0,5 a 4 μM induziu a formação direta de PLBs sem a formação de calo. No entanto, BEGUM et al. (1994), HUAN et al. (2004) e HUAN e TANAKA (2004) trabalhando com *Cymbidium*, e ISHII et al. (1998) com *Phalaenopsis*, induziram calos embriogênicos de discos de PLBs com a utilização de ANA e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D). ROY e BANERJEE (2003) obtiveram a formação de calos em meristemas apicais de *Dendrobium fibriatum* Lindl. (Orchidaceae) com a combinação de ANA e BAP. Para esses autores é evidente que a auxina exógena combinada a citocinina é o mais importante fitorregulador para a indução de calos embriogênicos.

NAYAK et al. (2002), utilizando secções transversais de PLBs de *Cymbidium aloifolium*, obtiveram os melhores resultados de porcentagem de explantes regenerando novos PLBs (53,71%) e número de PLBs por disco (7,7) em meio de cultura adicionado de 13,5 μM de ANA. Sendo diferente do obtido no presente trabalho, no qual a melhor concentração para a formação de PLBs foi de 0,5 μM de ANA combinado com 0,5 μM de BAP, o que resultou em 92,5% de explantes regenerando novos PLBs e 7,03 PLBs por disco.

A elevação da concentração de ANA levou a um aumento na porcentagem de explantes necróticos, chegando a 40% com a adição de 4 μM de ANA (Figura 2.3 e 2.8). Portanto, concentrações mais elevadas (13,5 μM), como a utilizada por NAYAK et al. (2002), provavelmente elevaria ainda mais a porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis'.

Os melhores resultados para *Cymbidium* 'Joy Polis' foram obtidos com ANA combinado com BAP. O mesmo foi observado por BEGUM et al. (1994), em discos de PLBs de *Cymbidium* x Thanksgiving 'Nativity', em meio de cultura MS adicionado de 2,7 μM de ANA e 2,2 μM de BAP. Esses autores afirmaram que, nos tratamentos com ANA isolado (0,54; 2,7 e 5,4 μM), houve um atraso no desenvolvimento dos PLBs em plantas aos noventa dias de cultura, quando comparados aos outros tratamentos com ou sem fitorreguladores. No caso de *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae), TENG et al. (1997) também observaram que a combinação de ANA e

BAP, 5,37 e 0,44 μM respectivamente, induziu a formação de novos PLBs em discos de PLB. No entanto, atrasou o desenvolvimento desses PLBs em plantas, fato que não foi observado no cultivar desse estudo.

Orquídeas necessitam de um balanço de auxinas e/ou citocininas para a formação de PLBs *in vitro* e posterior desenvolvimento de plantas (ARDITTI e ERNST, 1993). A combinação, concentração e a relação entre esses hormônios são muito importantes e variam conforme as espécies (TENG et al., 1997). Em *Spathoglottis plicata*, a razão ANA:BAP mais eficiente foi de 12,2 para a indução de PLBs (TENG et al., 1997); em *Dendrobium antennatum* (Orchidaceae), a razão foi de 0,42 (KUKULCZANKA e WOJCIECHOWSKA, 1983).

A cultura mantida 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação resultou num maior número de PLBs regenerados por disco que a cultura mantida 90 dias sob iluminação (7,03 e 3,25 respectivamente). A cultura de ápices radiculares de *Clowesia warscewiczii* mantida no escuro foi mais efetiva na formação de PLBs do que aquela mantida sob iluminação (KERBAUY e ESTELITA, 1996). No entanto, para a cultura *in vitro* de rizomas de *Cymbidium forrestii*, as culturas mantidas no escuro apresentaram massa fresca inferior a das culturas mantidas sob iluminação (PAEK e YEUNG, 1991). Segundo PERES (2002), a manutenção de uma cultura no escuro, evita a oxidação do explante na fase de estabelecimento, devido à inibição da ação de uma enzima dependente da luz, envolvida na produção de compostos fenólicos. Ainda, segundo o autor, a luz afeta a morfogênese de modo mediado por fotorreceptores como o fitocromo.

O processo de embriogênese somática direta ou indireta em orquídeas está baseado na formação de PLBs (ARDITTI e ERNST, 1993; BEGUM et al., 1994). Nesse trabalho foi observada a embriogênese somática direta, sendo os PLBs desenvolvidos pela proliferação das células das camadas epidérmicas e subepidérmicas. No início do desenvolvimento dos PLBs forma-se uma conexão vascular com o tecido de origem por meio de um cordão procambial. Mas com o crescimento desses PLBs inicia-se o estrangulamento na base, separando-os do tecido de origem, e culminando em novos PLBs.

ISHII et al. (1998) e HUAN et al. (2004) obtiveram PLBs via embriogênese indireta em *Phalaenopsis* e *Cymbidium*, respectivamente, e ambos os autores observaram que os PLBs emergiam do calo sem estabelecer conexão vascular.

BEGUM et al. (1994), analisando secções longitudinais de PLBs de *Cymbidium* em meio de cultura MS, adicionado de 2,2 μ M de BAP e 0,54 μ M de ANA, observaram que, após sete dias de cultura, ocorria a ruptura da epiderme, mas que esse fato não estava envolvido na formação dos PLBs. Nesse trabalho, não foi observada essa ruptura da epiderme no início do desenvolvimento dos PLBs, somente na base desses quando eles já estavam totalmente desenvolvidos.

O surgimento de raízes nos PLBs é tardia e ocorre no mesmo meio de cultura inicial, não havendo a necessidade de transferência para meio de cultura livre de fitorreguladores. Esse surgimento tardio das raízes, após 60 dias de cultura, também foi observado por PARK et al. (2003) em PLBs regenerados de folhas de *Doritaenopsis* (Orchidaceae).

3.5 CONCLUSÃO

O protocolo de regeneração de plantas a partir de discos de PLBs é um eficiente método para a multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis', pois além de formar novos PLBs, esses produzem plantas com parte aérea e raízes bem desenvolvidas no mesmo meio de cultura. O tratamento mais indicado é o de 0,5 μ M de ANA combinado a 0,5 μ M de BAP mantido 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação. Pelas análises anatômicas pode-se observar que os PLBs, originados diretamente das células das camadas epidérmica e subepidérmicas, apresentam uma folha (coleóptile) que protege o meristema apical caulinar e conexão vascular com o tecido de origem. A separação do PLB do disco de origem ocorre a partir da instalação de uma zona de abscisão. Cada PLB pode dar origem a 16,3 plantas em quatro meses.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.

BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, v. 63(3), p. 663-673, 1994.

CHANG, C.; CHANG, W. C. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 251-255, 1998.

CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 143-149, 1999.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Science**, v. 160, p. 87-93, 2000.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of tissue conditions and explant characteristics on direct somat embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey' **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 69, p. 41- 44, 2002.

FEDER, N.; O'BRIEN. T.P.. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M.; Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo strutures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, v. 166, p. 1443-1449, 2004.

HUAN, L. V. T.; TANAKA, M. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 406-410, 2004.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T. GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogeneses of Phalaenopsis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 446-450, 1998.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. MacGraw-Hill Book Co, New York.

KERBAUY, G. B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 27-29, 1984.

KERBAUY, G. B; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apexes of *Clowesia warscewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8 (2), p. 157-159, 1996.

KUKULCZANKA, K.; WOJCIECHOWSKA, W. Propagation of two *Dendrobium* species by *in vitro* culture. **Acta Horticulturae**, v. 131, p. 105-110, 1983.

LAKSHMANAN, P.; LEE, C.L.; GOH C.J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel approach - Thin section culture. **Journal of Orchids Society India**, v. 10 (1-2), p. 31-41, 1996.

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

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 107-116, 2002.

PAEK, K. Y.; YEUNG, E. C. The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N⁶-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 24, p. 65-71, 1991.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science**, v. 164, p. 919-923, 2003.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, 2002.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. f. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 333-340, 2003.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O. Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*. **Botanical Gazette**, v. 132, p. 65-70, 1971.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L.; TENG, M. C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 831-835, 1997.

CAPÍTULO III

Multiplicação *in vitro* de brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis'
(Orchidaceae)

RESUMO

O método convencional de propagação vegetativa de orquídeas pela separação de touceiras é extremamente lento, o que o torna inviável em escala comercial, apesar de proporcionar uma descendência geneticamente idêntica à planta matriz. A micropropagação é utilizada para a propagação clonal em grande escala de plantas comercialmente importantes. As maiores vantagens desta técnica são a multiplicação rápida e a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente. A multiplicação de orquídeas do gênero *Cymbidium* por sementeira possui limitações como uma baixa taxa de germinação. Além disso, plantas híbridas dificilmente produzem sementes ou quando as produzem essas são na maioria inférteis. O objetivo desse trabalho foi a multiplicação *in vitro* de brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Foram utilizadas brotações apresentando de 3 a 4 folhas e com 0,5 a 1,5 cm de comprimento. O meio de cultura foi o MS adicionado de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) nas seguintes concentrações: 0; 2,5; 5; e 10 μM de BAP e as mesmas concentrações de BAP combinadas com 0,5 μM de AIB. As avaliações foram realizadas após 90 dias, sendo consideradas as variáveis número de brotações por explante, porcentagem de crescimento da brotação inicial e comprimento médio das brotações laterais formadas. Foi possível observar que os tratamentos com 2,5 e 5 μM de BAP proporcionaram o maior número de brotações por explante, apesar de não diferirem estatisticamente das outras concentrações, somente do controle. Nos tratamentos com a adição de fitorreguladores, os explantes liberaram compostos fenólicos no meio de cultura. Com a elevação da concentração de BAP houve uma redução na porcentagem de crescimento da brotação inicial e no comprimento médio das brotações laterais formadas. A concentração mais indicada de BAP para a multiplicação de brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis' foi a de 2,5 μM , por proporcionar o maior número de brotações por explante (2,38) e pelo menor custo, em relação à concentração de 5 μM .

Palavras chave: micropropagação, plantas ornamentais, fitorregulador, BAP, AIB

ABSTRACT

The traditional method of vegetative propagation used for orchid by separation of shoots is slow, and is not recommended at commercial scale, though it furnishes new plants genetically identical to matrix plant. Micropropagation is used for clonal propagation of commercially important plants in large scale. The main advantages of this technique are the fast multiplication and the obtention of homogeneous population of genetically improved plants. The multiplication of orchid of genus *Cymbidium* by seedling has limitations like low germination rate. Hybrid plants rarely produce seeds, and if it produces, they are almost all unviable. The objective of this study was the in vitro multiplication of *Cymbidium* 'Joy Polis'. Shoots with 3 to 4 leaves and 0.5 to 1.5 cm high were used. The culture medium was MS supplemented with N⁶ – benzyladenine (BA) and indole-3-butiric acid (IBA) in the following concentrations: 0; 2.5, 5 and 10 µM BA and the same BA concentrations with 0.5 µM IBA. After 90 days, the number of shoots per explant, initial shoot growth percentage and height of the lateral shoots were evaluated. The treatment with 2.5 and 5 µM of BA showed the biggest number of shoots per explant, although there was no significant differences between the treatments, with exception of control. In the treatments with growth regulators, the explants produced phenolic substances in the culture medium. With the elevation of BA concentrations the growth percentage of the initial shoots and the height of the new lateral shoots were reduced, in comparison with control medium. The best concentration of BA for *Cymbidium* 'Joy Polis' shoot multiplication was 2.5 µM, as it showed the highest number of explant per shoot (2.38) and the lowest cost when compared to 5 µM BA.

Key words: micropropagation, ornamental plants, growth regulators, BA, IBA

4.1 INTRODUÇÃO

Cymbidium é um gênero com aproximadamente 50 espécies originárias da Ásia, mas a maioria das *Cymbidium* cultivadas são híbridos. Muitos desses híbridos são comercialmente importantes como flor de corte e de vaso (HUAN et al. 2004). Desde o desenvolvimento do método de germinação assimbiótica de sementes de orquídeas por KNUDSON (1946), a cultura de tecidos tem sido utilizada para a propagação em larga escala de um grande número de espécies e de híbridos de orquídeas (ARDITTI e ERNST, 1993). *Cymbidium* foi o primeiro gênero de orquídea a ser propagado *in vitro* usando o meristema apical como explante (MOREL, 1960), e mais recentemente, outros explantes tem sido utilizados, como rizoma (PAEK e YEUNG, 1991), raiz, folha e pseudobulbo (CHANG e CHANG, 1998), botão floral (SHIMASAKI e UEMOTO, 1991) e PLBs (BEGUM et al., 1994; NAYAK et al., 2002; HUAN et al., 2004; HUAN e TANAKA, 2004).

Explantos de *Cymbidium aloifolium*, quando cultivados em meio MS suplementado com 9,8 μ M de ácido indolbutírico (AIB) apresentaram 85% de enraizamento em 30 dias (NAYAK et al., 2002). No entanto, para *Cymbidium kanran*, obteve-se maior porcentagem de enraizamento, em torno de 60%, utilizando 10% de água de coco (HASEGAWA e GOI, 1987).

A taxa de multiplicação de espécies de *Cymbidium* orientais em condições naturais é reduzida quando comparada à das orquídeas tropicais e subtropicais; além disso, a propagação clonal de espécies e híbridos de orquídeas de regiões temperadas geralmente é mais exigente que a de espécies tropicais (PAEK e YEUNG, 1991). Desse modo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método para a multiplicação *in vitro* de brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis', com o uso de BAP e AIB.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Brotações apresentando de 3 a 4 folhas e medindo de 0,5 a 1,5 cm de comprimento, oriundas de PLBs regenerados de meristemas de brotações laterais, foram isoladas e repicadas para o meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), com pH ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl a 0,1 N, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os tratamentos testados foram testemunha (sem fitorregulador) e BAP (2,5; 5 e 10 µM) isolado ou combinado com AIB (0,5 µM).

As avaliações foram realizadas após 90 dias, sendo consideradas as seguintes variáveis: número de brotações por explante, porcentagem de crescimento da brotação inicial e comprimento médio das brotações laterais formadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições de dez explantes cada, totalizando 280 explantes.

Após a avaliação desse experimento, as brotações resultantes foram transferidas para o meio de cultura MS adicionado de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. Foram utilizados frascos com volume de 350 ml, 13 cm de altura e 6 cm de diâmetro contendo 25 ml de meio de cultura. Em cada frasco foram colocadas cinco plantas.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Inicialmente, as variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram as médias dos tratamentos testadas por meio do teste de F, enquanto que as que apresentaram heterogeneidade tiveram seus valores transformados para posterior análise. Quando as médias dos tratamentos foram diferentes estatisticamente, essas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as variáveis analisadas foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as médias; os resultados estão apresentados na Tabela 3.1 e a análise de variância para as variáveis analisadas nos Anexos 9 a 11. Na variável número de brotações por explante é possível observar que os tratamentos com 2,5 e 5 μM de BAP proporcionaram os maiores valores e diferiram significativamente do controle (Tabela 3.1). NAYAK et al. (1997) obtiveram os melhores resultados para a formação de brotos laterais em brotações de *Cymbidium aloifolium* com a utilização de 22 μM de BAP sozinho ou combinado a 5,4 μM de ANA. No entanto, para SILVA (2003), o uso de BAP (0 - 18 μM) não promoveu nenhum efeito para a multiplicação de *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow.

TABELA 3.1 - Resultados de multiplicação de brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivadas em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP combinado ou não com AIB, após 90 dias.

Concentrações (μM)		Número de brotações por explante	Porcentagem de crescimento da brotação inicial	Comprimento médio das brotações laterais
BAP	AIB			
0	0	1,00 b	79,90 a	----
2,5	0	2,38 a	63,20 abc	1,42 ab
5	0	2,35 a	37,16 c	1,37 ab
10	0	1,85 ab	47,46 bc	0,75 bc
2,5	0,5	1,85 ab	68,25 ab	1,58 a
5	0,5	1,68 ab	48,19 bc	1,77 a
10	0,5	1,48 ab	46,29 bc	1,15 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CARVALHO (2002), utilizando plântulas de *Cattleya walkeriana*, sem raízes e com as folhas reduzidas a 1/3, obteve o melhor resultado de multiplicação sem a adição de fitorreguladores (3,53 brotações por explante). Para este autor, com o aumento na concentração de 2,4-D houve a redução na multiplicação e com a utilização de BAP não houve influência na formação de novas brotações. Porém, MAURO et al. (1994), utilizando o mesmo tipo de explante de *Cattleya aurantiaca* Rolf, obteve maior número de gemas adventícias utilizando 44,38 μM de BAP e 0,54 μM de ANA. VENTURA (2002), também utilizando o mesmo tipo de explante, definiu como melhor concentração para a multiplicação de *Brassolaeliocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia purpurata*, 5,33 μM de BAP (4,8 brotações por explante).

O aumento na concentração de BAP (Tabela 3.1), quando combinado ou não com AIB, reduziu a porcentagem de crescimento da brotação inicial e o comprimento médio das brotações laterais formadas (Figura 3.1A-B). As brotações mais alongadas são mais desejáveis, pois não será necessário utilizar um meio de cultura para o alongamento dos explantes, podendo transferi-las diretamente para o meio de cultura de enraizamento.

Nos tratamentos com fitorreguladores, os explantes liberaram compostos fenólicos no meio de cultura, alterando a coloração (Figura 3.1A). Resultados semelhantes foram obtidos com rizomas de *Cymbidium forrestii*, quando cultivados *in vitro* na presença de 22 e 44 μM de BAP, os quais liberaram compostos fenólicos no meio de cultura, tornando a cor deste de amarelo a marrom (PAEK e YEUNG, 1991). Esses mesmos autores adicionaram carvão ativado no meio de cultura para evitar a oxidação, porém observaram que houve uma inibição do desenvolvimento do rizoma e massa fresca.

CHANG e CHANG (2000), utilizando rizomas de *Cymbidium sinense* Willd, obtiveram maior indução de gemas adventícias (2,5 por explante) utilizando 4,54 μM de tidiazuron (TDZ). LU et al. (2001), utilizando o mesmo tipo de explante de *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa', em meio de cultura com 20 μM de BAP, obtiveram 7,3 brotações por explante.

As brotações transferidas para o meio de cultura MS adicionado de 1 g L⁻¹ de carvão ativado apresentaram 100% de enraizamento após 30 dias (Figura 3.2A-B), sem necessidade de adição de auxina. A primeira descrição de utilização de carvão ativado para o cultivo *in vitro* de orquídeas foi realizada por WERCKMEISTER

(1971), o qual observou que raízes de *Cymbidium* cultivadas em meio de cultura acrescido de carvão ativado cresciam para dentro do meio de cultura, diferentemente do que ocorria nas cultivadas na ausência do carvão ativado, cujas raízes se desenvolviam para cima, em direção à luz. Tais características também foram observadas neste trabalho. Segundo PAN e STADEN (1998), a adição de carvão ativado no meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo do tecido e da espécie utilizada. O carvão ativado promove a estabilização, o escurecimento e a absorção de substâncias inibidoras, compostos orgânicos e de fitorreguladores do meio de cultura.

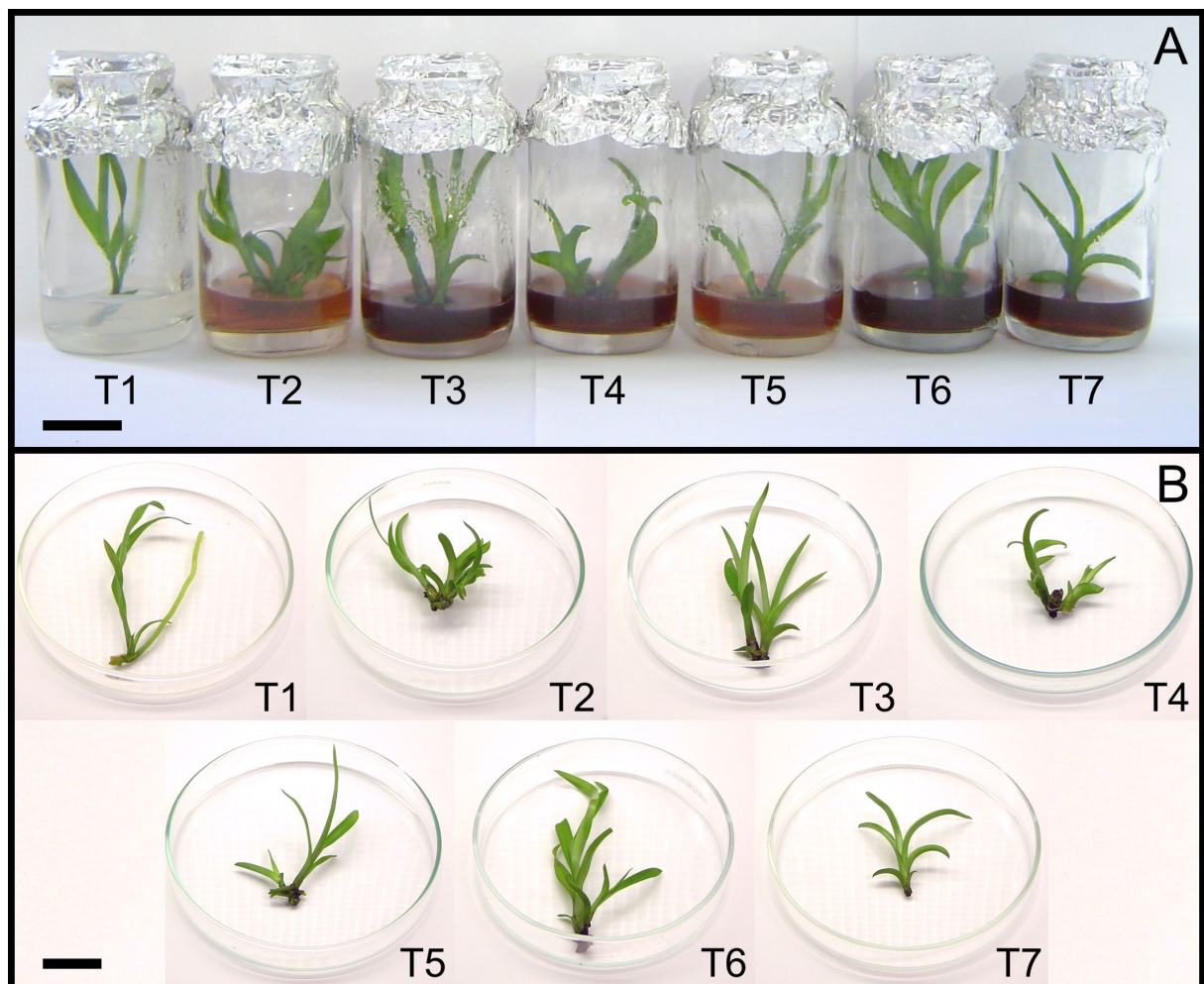


FIGURA 3.1 – A-B. Brotações de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP combinado com AIB. T1. sem BAP; T2. 2,5 μ M de BAP; T3. 5 μ M de BAP; T4. 10 μ M de BAP; T5. 2,5 μ M de BAP e 0,5 μ M de AIB; T6. 5 μ M de BAP e 0,5 μ M de AIB; T7. 10 μ M de BAP e 0,5 μ M de AIB. Barra = 2,0 cm.

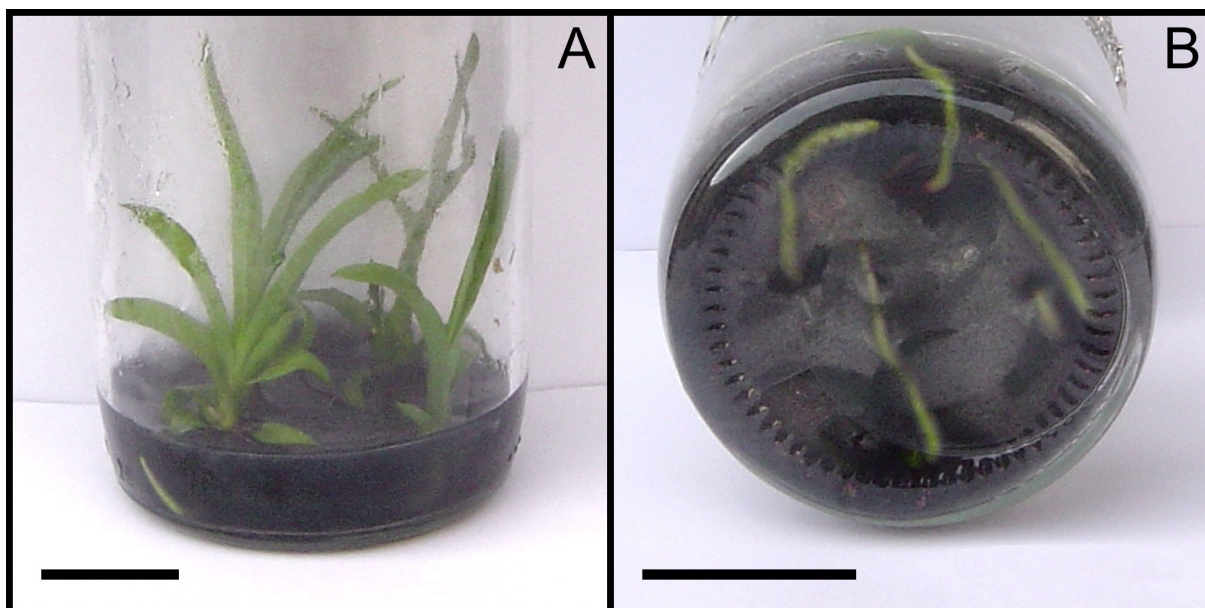


FIGURA 3.2 – A-B. Enraizamento de *Cymbidium* 'Joy Polis' em meio de cultura MS acrescido de carvão ativado, após 30 dias. Barra = 2,0 cm.

4.4 CONCLUSÃO

A multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis' utilizando brotações foi possível, porém, com baixa eficiência nas concentrações de BAP e AIB utilizadas. O melhor resultado foi obtido com a utilização de 2,5 μM de BAP, o qual diferiu da testemunha. A adição de carvão ativado foi eficiente para a indução e desenvolvimento de raízes.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682 p.

BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, v. 63(3), p. 663-673, 1994.

CARVALHO, V. S. **Morfogênese *in vitro* em orquídeas do grupo *Cattleya***. Viçosa, 2002. 164 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.

CHANG, C.; CHANG, W. C. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 251-255, 1998.

CHANG, C.; CHANG, W. C. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 171-175, 2000.

HASEGAWA, A.; GOI, M. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. and *Cymbidium kanran* Makino in shoot-tip culture. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, v. 56, n. 1, p. 70-78, 1987.

HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, v. 166, p. 1443-1449, 2004.

HUAN, L. V. T.; TANAKA, M. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 406-410, 2004.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214-217, 1946.

LU, I-lun; SUTTER, E.; BURGER, D. Relationships between benzyladenine uptake, endogenous free IAA levels and peroxidase activities during upright shoot induction of *Cymbidium ensifolium* cv. Yuh Hwa rhizomes *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 161-170, 2001.

MAURO, M.; SABAPATHI, D.; SMITH, R. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. **Lindleyana**, v. 9, n. 3, p. 169-173, 1994.

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

NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, v. 71, p. 243-250, 1997.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 107-116, 2002.

PAEK, K. Y.; YEUNG, E. C. The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N⁶-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 65-71, 1991.

PAN, M. J.; STADEN, J. van The use of charcoal in in vitro culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p. 155 – 163, 1998.

SILVA, E. F. Da **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow***. Lavras, 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras.

SHIMASAKI, K.; UEMOTO, S. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 49-52, 1991.

VENTURA, G. M. **Propagação in vitro de orquídeas do grupo *Cattleya***. Viçosa, 2002. 147 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa.

WERCKMEISTER, P. Light Induction of Geotropism, and the Control of Proliferation and Growth of *Cymbidium* in Tissue Culture. **Botanical Gazette**, v. 132, n. 4, p. 346-350, 1971.

CAPÍTULO IV

Aclimatização em diferentes substratos e morfo-anatomia de mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis'

RESUMO

As orquídeas do gênero *Cymbidium* estão entre as mais comercializadas em todo o mundo. Na fase de cultivo *in vitro* as plantas são mantidas em um ambiente com condições de alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, resultando em baixas taxas de transpiração. Assim, uma das fases mais críticas da micropropagação é a aclimatização das mudas. Plantas *in vitro* normalmente apresentam baixa taxa de fotossíntese, não possuem estômatos nem raízes funcionais e sua cutícula é delgada. Portanto, quando essas mudas são expostas ao meio *ex vitro*, sofrem estresse que pode causar a morte. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de aclimatização e analisar a estrutura anatômica de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos. Plantas com 4 a 6 folhas apresentando raízes foram removidas do meio de cultura MS e transferidas para vasos individuais. Foram realizados dez tratamentos com diferentes substratos e misturas. Para a análise anatômica qualitativa foram coletadas amostras de folhas e raízes de plantas *in vitro*, aclimatizadas e *ex vitro* (planta matriz). Após 45 dias, não foi observado crescimento em altura nas mudas. Os diferentes tratamentos propiciaram 100% de sobrevivência das mudas. Os melhores resultados no ganho de massa fresca foram obtidos nos substratos que continham fibra de coco em pó sozinha ou combinada a RendMax®, vermiculita e fibra de coco. As alterações anatômicas nas plantas cultivadas *in vitro*, facilitaram a aclimatização das mudas, visto que a sobrevivência dessas foi de 100% em todos os substratos testados. O substrato mais indicado para a aclimatização das mudas foi a fibra de coco em pó combinada com fibra de coco, devido a seu baixo custo e eficiência.

Palavras chave: Orchidaceae, orquídea, micropropagação, morfologia, fibra de coco

ABSTRACT

Cymbidium orchids are among the most commercialized plants in the world. During *in vitro* culture the plants are kept under conditions of high relative humidity, low luminosity and reduced gas exchange, resulting in low rates of transpiration. One of the most critical points of micropropagation is acclimatization. *In vitro* plants normally have low photosynthesis rate, don't have functional stomata and roots, and their cuticle is reduced. So, when these plants are exposed to *ex vitro* conditions they suffer stress, which can induce mortality. The purpose of this study was to investigate the acclimatization capacity and the anatomical structure of *Cymbidium* 'Joy Polis' in different substrates. Plants with 4 to 6 leaves and roots were removed from MS medium and transferred to individual pots. Ten treatments were tested with different substrates and mixtures. For qualitative anatomical analyses root and leaf samples of the *in vitro*, acclimatized and *ex vitro* plants (matrix) were collected. After 45 days, no differences in the shoot size were observed. The different treatments gave 100% of survival. The best results in mass profit were obtained in the treatment with coconut powder or in a mixture with RendMax®, vermiculite and coconut fiber. The anatomical changes in *in vitro* plants made easier plant acclimatization. The most indicated substrate for plant acclimatization is coconut powder in a mixture with coconut fiber, given its low cost and efficiency.

Key words: Orchidaceae, orchid, micropropagation, morphology, coconut fiber

5.1 INTRODUÇÃO

As orquídeas do gênero *Cymbidium* Hort. estão entre as orquídeas comercialmente mais importantes no mundo, sendo esse gênero muito popular no Japão (BEGUM et al., 1994). Esse gênero é constituído de numerosas espécies e plantas híbridas originadas a partir de trabalhos de melhoramento genético (LORENZI e SOUZA, 2001).

Plantas micropropagadas, quando em ambiente *in vitro*, crescem em condições de alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, resultando em baixas taxas de transpiração e fotossíntese (SHACKEL et al., 1990). Aclimatização é a adaptação de um organismo a um novo ambiente (COSTA, 1998). Durante o processo de aclimatização das plantas crescidas *in vitro* em casa-de-vegetação, ocorrem mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas, tornando-as capazes de crescer nesse novo ambiente (SUTTER et al., 1992). Esse processo pode causar estresse para as plantas, sendo um fator limitante no processo da micropropagação (SUTTER, 1988). Em angiospermas, a cutícula delgada, os estômatos não funcionais e o parênquima paliçádico pouco desenvolvido são citados como a principal causa da mortalidade de plantas transferidas de um ambiente *in vitro* para um *ex vitro* (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1982; DHAWAN e BHOJWANI, 1987; REUTHER, 1988; DÍAZ-PÉREZ et al., 1995).

Os estômatos das plantas *in vitro* podem se apresentar levemente projetados e abertos, com diferentes tamanhos e formatos e não uniformemente distribuídos (DONNELLY e VIDAVER, 1984; JOHANSSON et al., 1992). Também pode haver redução no número de elementos condutores, como registrado por ALBARELLO et al. (2001) em *Rollinea mucosa*. Essas alterações anatômicas nas plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar a aclimatização das mesmas (ALBARELLO et al., 2001).

De acordo com RODRIGUES et al. (2005), o sucesso na aclimatização de plantas micropropagadas depende da seleção de um substrato adequado, pois ele tem efeito direto na sobrevivência das plantas. Diferentes autores citam a vermiculita como um substrato não eficiente para aclimatização (HOFFMANN et al., 2001; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). No entanto, para outros autores a vermiculita pura ou em mistura foi o melhor substrato durante o cultivo (FARIA et al., 2001).

Segundo DEMATTÊ e DEMATTÊ (1996), o cultivo de orquídeas pode ser realizado em diferentes substratos, geralmente de origem vegetal ou mineral e até mesmo sintéticos. O substrato adequado para o cultivo de orquídeas deve ter consistência para o suporte da planta, boa aeração para as raízes e capacidade de retenção de água (SILVA e SILVA, 1997). A maioria das orquídeas sobrevive a longos períodos de estiagem, mas não suporta substrato com drenagem deficiente (BATCHELOR, 1981).

O xaxim, formado pelas raízes adventícias de algumas samambaias das famílias Dicksoniaceae e Cyatheaceae, era o substrato mais apreciado pelos orquidófilos e colecionadores de todo o mundo. Porém, no Brasil, o xaxim encontra-se em processo de extinção devido ao extrativismo, apesar das leis que o protegem. Desse modo, torna-se importante à busca por substratos equivalentes que possam substituir o xaxim (DEMATTÊ e DEMATTÊ, 1996).

A escolha adequada de um substrato deve levar em conta fatores de ordem econômica, química e física do material. Entre os fatores de ordem econômica está o custo, a disponibilidade, a qualidade e a facilidade de manuseio (WENDLING e GATTO, 2002). Por exemplo, a fibra da casca de coco é adequada para o uso como substrato por sua facilidade de produção, baixo custo e alta disponibilidade (CARRIJO et al., 2002). Além disso, a fibra de coco verde apresenta propriedades físico-químicas desejáveis, como por exemplo: porosidade total de 95,6%; capacidade de aeração de 45,5% e água facilmente assimilável (19,8%). Um substrato ideal deve possuir porosidade acima de 85%, capacidade de aeração entre 10 e 30% e água facilmente assimilável de 20 a 30%. Portanto, as propriedades da fibra de coco conferem ao seu substrato características de boa qualidade, além de possuir grande durabilidade.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis' e analisar a estrutura anatômica destas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, (25°25'40S, 49°16'23W) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). E a análise anatômica no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

5.2.1 Material

O material vegetal utilizado foi híbridos de *Cymbidium* 'Joy Polis', obtidos de brotações laterais de 5 a 7 cm de comprimento da planta adulta, dos quais foram retirados meristemas das gemas laterais. Os meristemas foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), com pH ajustado para 5,8, com NaOH ou HCl a 0,1 N, e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. As plantas regeneradas foram multiplicadas em meio MS a fim de se obter um número suficiente de plantas para o experimento.

Mudas com 4 a 6 folhas, de 2 a 3 cm de comprimento, apresentando raízes, foram removidas do meio de cultura, lavadas com água para retirar o restante do meio de cultura e transferidas para vasos individuais com 5,5 cm de diâmetro e 4 cm de altura (Figura 4.1).

5.2.2 Substratos

Foram realizados dez tratamentos com os seguintes substratos:

- 1- Fibra de coco em pó
- 2- Fibra de coco em pó + RendMax® (para orquídeas e bromélias) (proporção 1:1)
- 3- Fibra de coco em pó + vermiculita (proporção 1:1)
- 4- Fibra de coco em pó+ fibra de coco (proporção 1:1)

- 5- Fibra de coco
- 6- Vermiculita
- 7- Vermiculita + RendMax® (para orquídeas e bromélias) (proporção 1:1)
- 8- RendMax® (para orquídeas e bromélias)
- 9- PlantMax® (para hortaliças)
- 10- Casca de pinus (fina)

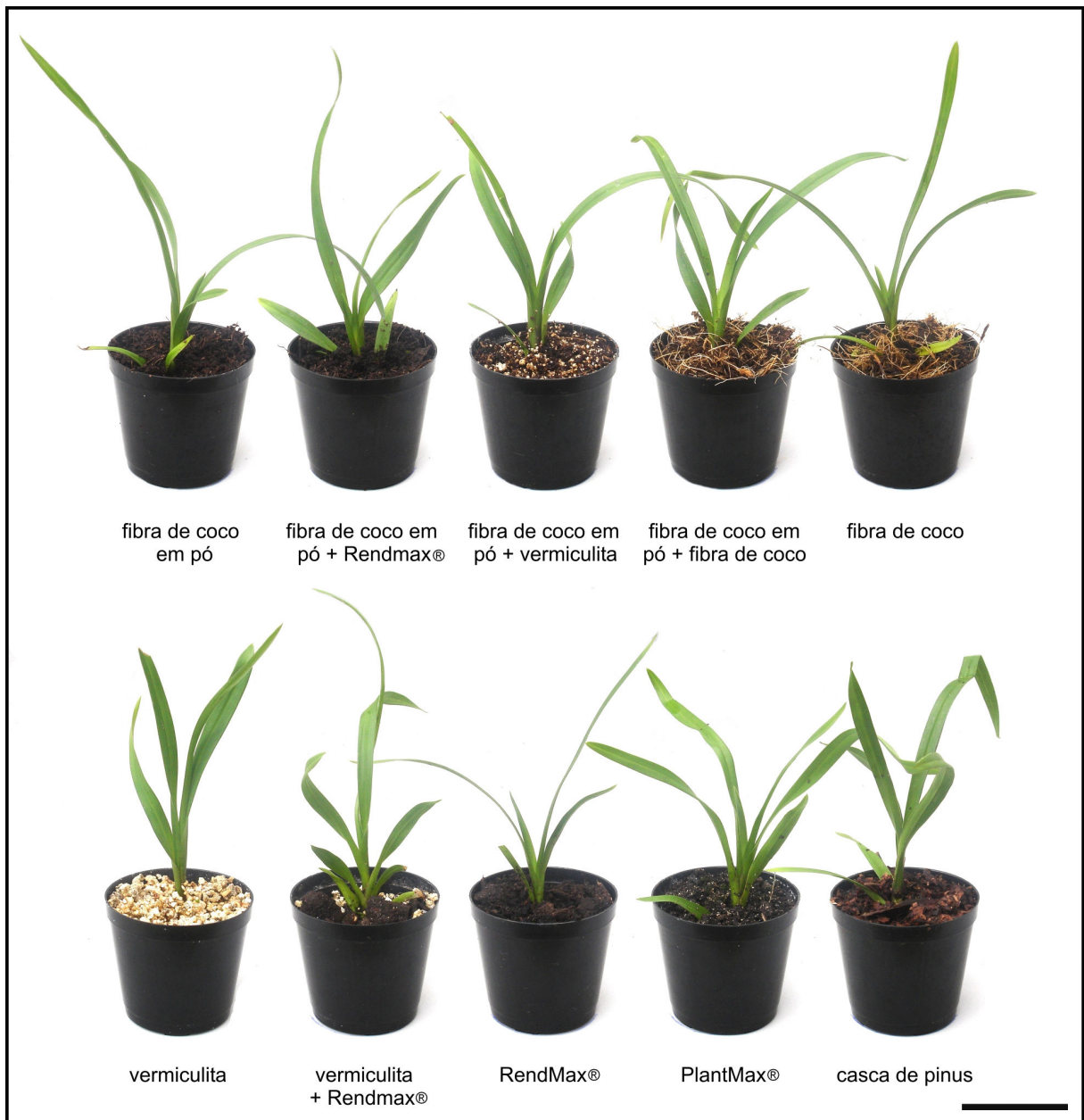


FIGURA 4.1: Diferentes substratos utilizados para a aclimatização de mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Barra: 4 cm.

As mudas ficaram em casa-de-vegetação com nebulização intermitente por cinco dias e, após esse período, com regas manuais conforme a necessidade, durante os meses de julho a setembro de 2004. Após 45 dias foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência das mudas, de crescimento em altura e de ganho na massa fresca, o número de raízes novas formadas e o comprimento das três maiores raízes novas formadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo testados dez tratamentos com quatro repetições de dez explantes cada, totalizando 400 plantas. As condições mínima e máxima de temperatura e umidade da casa-de-vegetação foram 11,16 e 25,17 °C e 53,97 e 99%, respectivamente (Anexo 12).

A composição e o pH dos substratos analisados no Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias, UFPR, estão indicadas na Tabela 4.1.

5.2.3 Análise anatômica

Para a análise anatômica qualitativa, foram coletadas amostras de folhas e raízes de plantas *in vitro*, aclimatizadas e *ex vitro* (planta matriz), as quais foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940). Esses materiais foram destinados à preparação de lâminas permanentes, sendo incluídos em meta-acrilatoglicol (historresina-Leica), segundo a técnica de FEDER e O'BRIEN (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação, e os cortes foram obtidos com 7 µm de espessura e corados com azul de toluidina (FEDER e O'BRIEN, 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte®). As fotomicrografias foram realizadas em microscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P200® acoplada. Foi realizado teste microquímico com o reagente lugol, para a detecção de amido nos ápices de raiz.

Para a análise da superfície epidérmica das folhas e raiz em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material botânico foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940), desidratado em série alcoólico etílico, e posteriormente pelo método do ponto crítico com CO₂ no aparelho Bal-Tec CPD 030. Após o ponto crítico, o material foi colado em suportes metálicos e metalizado com ouro, a

vácuo, no equipamento Balzers union FL 9496 SCD 030. A análise e o registro eletromicrográfico foram realizados com Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol (JSM 6360 LV), no Centro de Microscopia eletrônica da UFPR.

TABELA 4.1 - Caracterização dos diferentes substratos e misturas pela análise química.

Substratos	pH		Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	CTC*	P	C	V*
	CaCl ₂	SMP*Cmol/dm ³Mg/dm ³ ..				%	
Fibra de coco em pó	4,9	6,4	0,5	3,5	4,2	0,8	1,84	10,3	289	86	66
Fibra de coco em pó + RendMax®	4,6	5,8	0,23	6,0	4,8	2,3	1,3	14,4	133	108	58
Fibra de coco em pó + vermiculita	5,7	6,9	0,0	2,5	3,8	4,8	0,98	12,1	149	49	79
Fibra de coco em pó + fibra de coco	4,9	6,5	0,2	3,2	3,4	0,7	0,94	8,24	90,9	59	61
Fibra de coco	3,9	6,5	0,4	3,2	0,9	0,7	3,45	8,25	7,9	76	61
Vermiculita	6,2	7,2	0,0	2,0	0,9	8,1	0,13	11,1	1,6	0,9	82
Vermiculita + RendMax®	4,3	5,4	0,4	8,5	4,2	4,4	0,51	17,6	19,6	77	52
RendMax®	4,0	4,8	0,7	14,4	5,4	3,0	0,81	23,6	52,5	185	39
PlantMax®	4,2	5,0	0,4	24,5	17,4	7,2	1,06	50,2	458	158	51
Casca de pinus	3,7	4,9	1,0	13,2	2,6	1,6	0,69	18,1	45,5	123	27

*CTC = Capacidade de troca de cátions. V = Saturação por bases. SMP = Shoemaker, Maclean e Pratt (solução tampão)

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análise quantitativa das mudas

A sobrevivência das mudas foi de 100% para todos os tratamentos durante os 45 dias do experimento. No entanto, não foi observado incremento em altura das mudas em nenhum dos tratamentos durante esse mesmo período.

Os resultados de porcentagem de ganho na massa fresca, número de raízes novas formadas e comprimento das três maiores raízes novas formadas estão apresentados nas Figuras 4.2 a 4.4 e as análises de variância para as variáveis analisadas nos Anexos 13 a 15.

As maiores porcentagens de ganho de massa fresca foram obtidas nos substratos que possuíam fibra de coco em pó isolado ou combinado a outros substratos (Figura 4.2). Para a variável número de raízes novas formadas, o melhor resultado foi obtido no tratamento com os substratos fibra de coco em pó + fibra de coco, seguido pelos substratos fibra de coco, Rendmax® e casca de pinus (Figura 4.3).

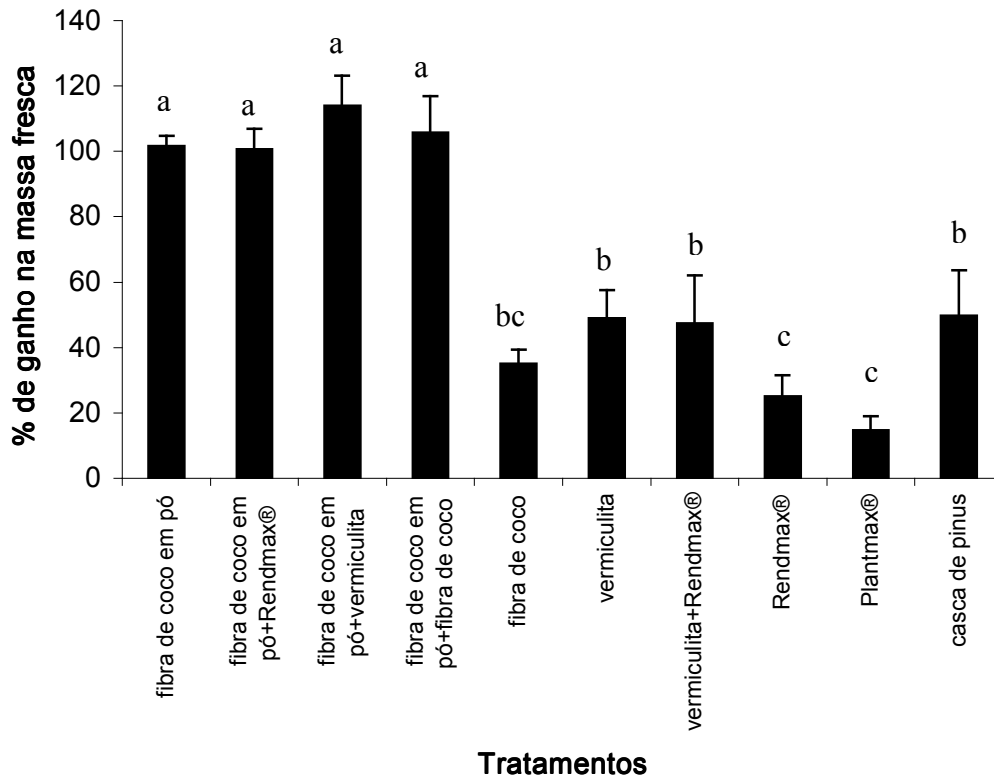


FIGURA 4.2 - Porcentagem de ganho na massa fresca de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

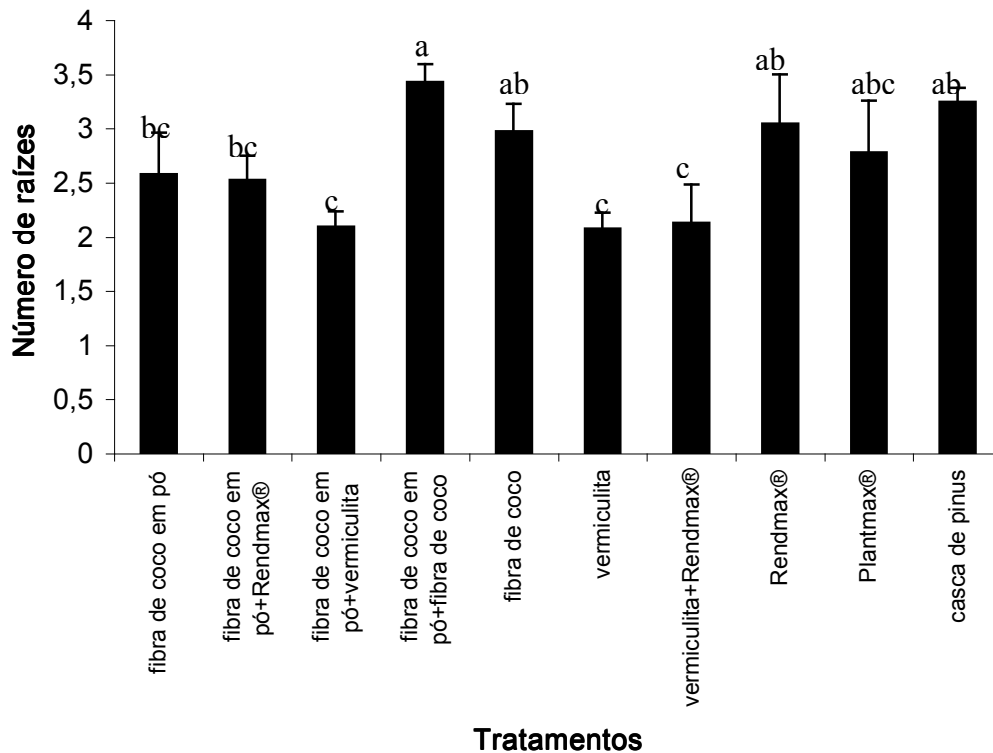


FIGURA 4.3 - Número médio de raízes de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O melhor resultado para o comprimento das três maiores raízes novas formadas foi obtido com o substrato fibra de coco em pó + fibra de coco (Figura 4.4). Dessa forma, os substratos mais indicados para a aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis', nessas condições experimentais, foram os com fibra de coco em pó isolado ou combinado a Rendmax®, vermiculita ou fibra de coco, sendo o substrato fibra de coco em pó + fibra de coco o mais indicado por ser significativamente superior aos demais substratos nas variáveis analisadas (Figura 4.5).

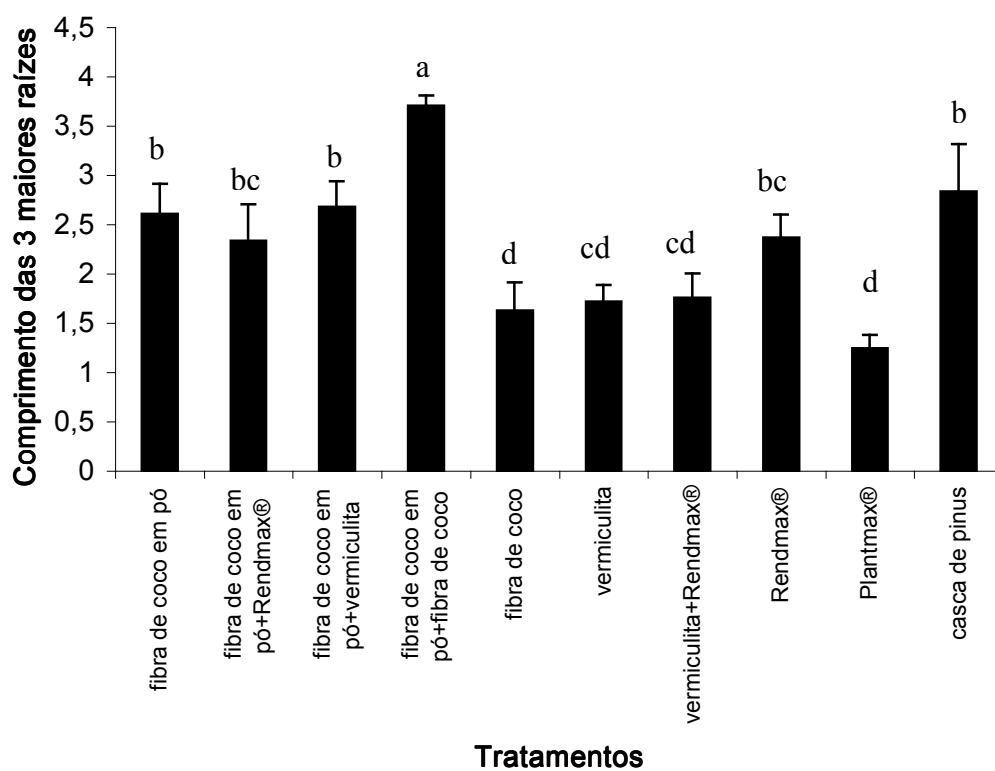


FIGURA 4.4 - Comprimento das 3 maiores raízes de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

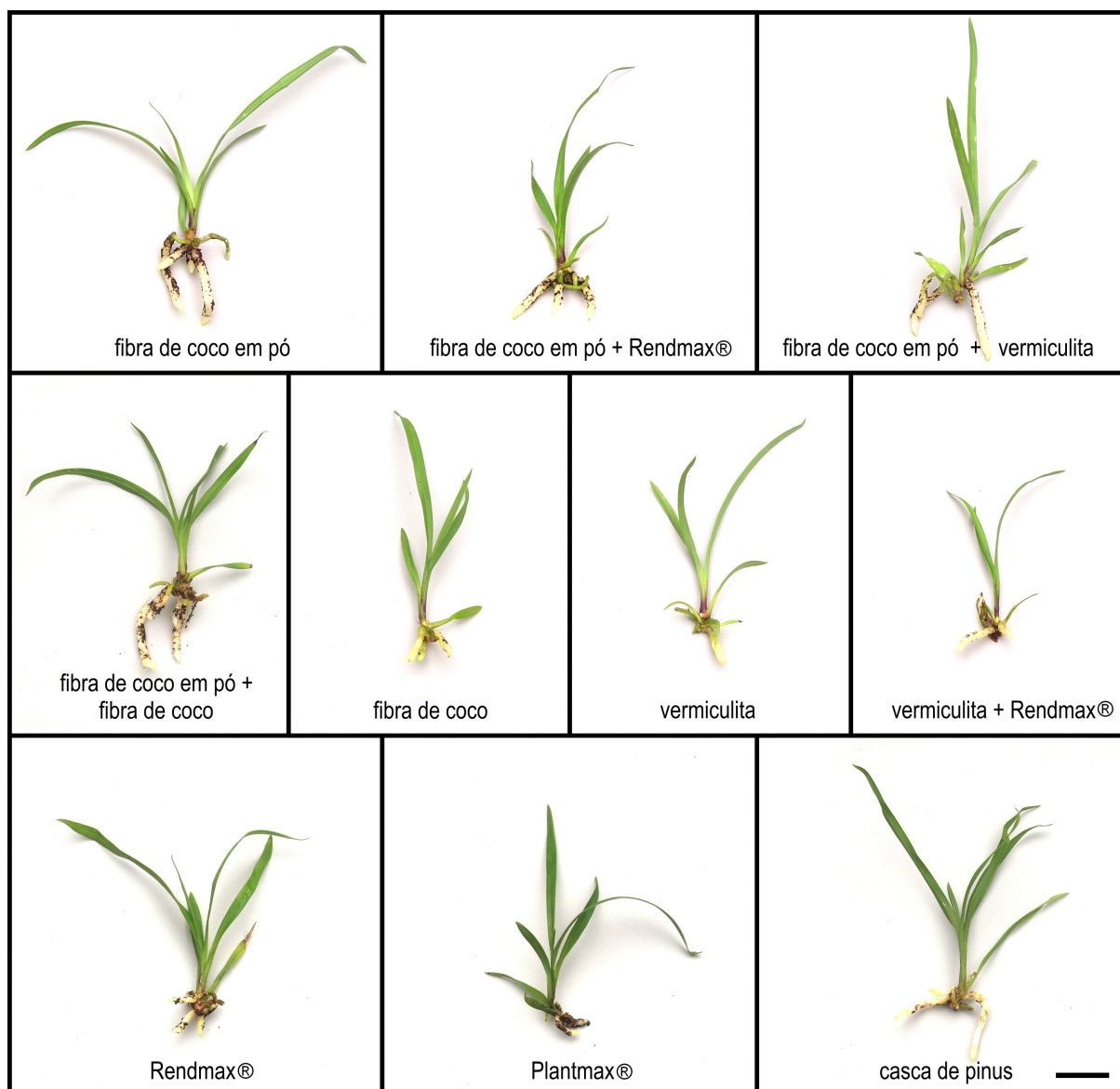


FIGURA 4.5 - Detalhe das mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis' após 45 dias da aclimatização nos diferentes substratos. Barra = 3 cm.

5.3.2 Resultados da análise anatômica

Na raiz da planta cultivada *ex vitro*, é possível observar a ausência de pêlos absorventes (Figura 4.6A). Ao contrário, a planta cultivada *in vitro* apresenta grande quantidade de pêlos absorventes (Figura 4.6B). Nas plantas aclimatizadas, os pêlos absorventes ocorrem em grupos dispersos (Figura 4.6C).

As raízes das plantas cultivadas *in vitro* apresentam geotropismo negativo, mas durante a aclimatização essas tornam a crescer normalmente. Testes com lugol foram realizados para tentar evidenciar a presença de amido nas raízes das plantas *ex vitro* e aclimatizadas. Porém, não foi identificada a presença de amido em nenhuma das plantas.

O ápice da raiz da planta *ex vitro*, em secção longitudinal, apresenta na região do promeristema células iniciais comuns, não sendo distinguíveis camadas distintas (Figura 4.7A). O formato do ápice de raiz da planta *ex vitro* é obtuso enquanto o *in vitro* é mais agudo (Figura 4.7A-B). Na planta *in vitro* as camadas meristemáticas apresentam células menos densas (Figura 4.7B). Já nas plantas aclimatizadas (Figura 4.7C), o meristema apical e a coifa se assemelham a raízes da planta *ex vitro*. No meristema fundamental das plantas cultivadas nos três ambientes ocorrem idioblastos contendo ráfides, estando em maior concentração na planta *in vitro* (Figura 4.7A-C).

A raiz da planta matriz em corte transversal tem características típicas da família Orchidaceae, como velame, córtex com exoderme e endoderme bem definidas e cilindro vascular poliarco. O velame das raízes das plantas *ex vitro*, é constituído por nove camadas de células. A exoderme possui células com parede periclinal externa e anticlinais espessadas, alternadas com células de passagem. O parênquima cortical é constituído de 14 a 16 camadas de células alongadas (Figura 4.8A), e a endoderme é unisseriada com células com espessamento em O nas regiões próximas ao floema alternadas com células de passagem de paredes delgadas próximas ao xilema. O periciclo também apresenta porções com células de parede espessada próxima ao floema e de parede delgada próxima ao xilema. O cilindro vascular é composto de 15 pólos floemáticos e xilemáticos, e medula parenquimática com células de paredes delgadas. O floema é totalmente envolvido por células de paredes espessadas (Figura 4.8B).

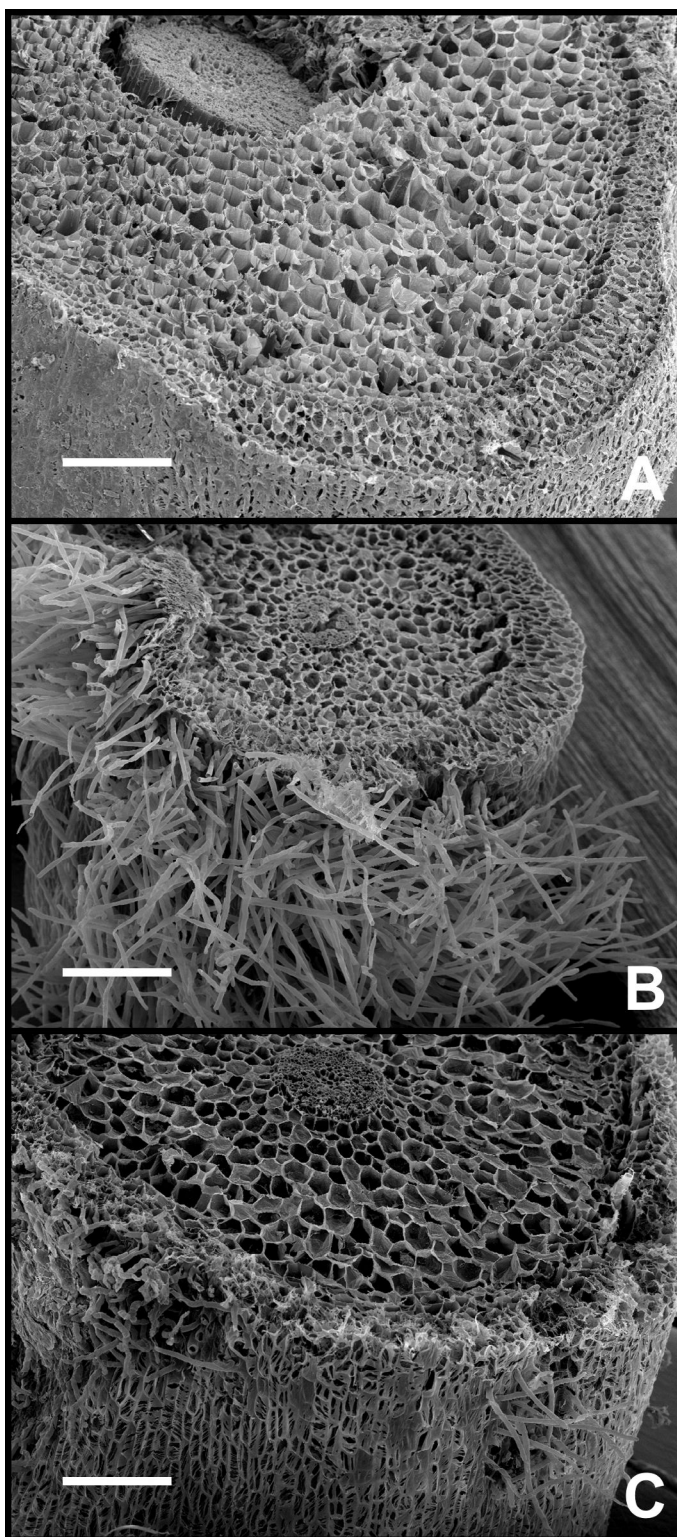


FIGURA 4.6 - Vista geral de um segmento da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. A. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, B. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, C. Planta aclimatizada. Barra A-C: 500 μ m.

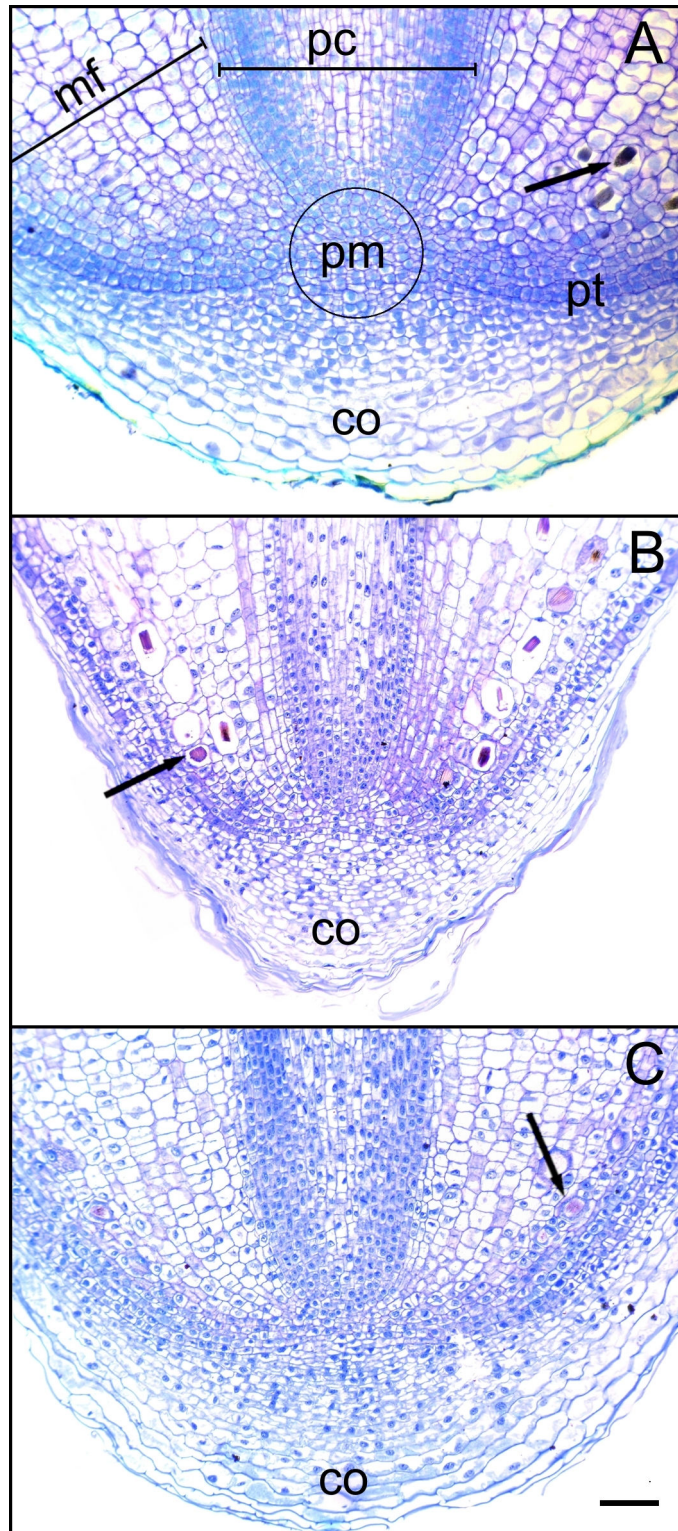


FIGURA 4.7 - Secções longitudinais do ápice de raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, B. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, C. Planta aclimatizada. co = coifa. mf = meristema fundamental. pc = procâmbio. pm = promeristema. pt = protoderme. seta = idioblastos com ráfides. Barra: 100 μ m.

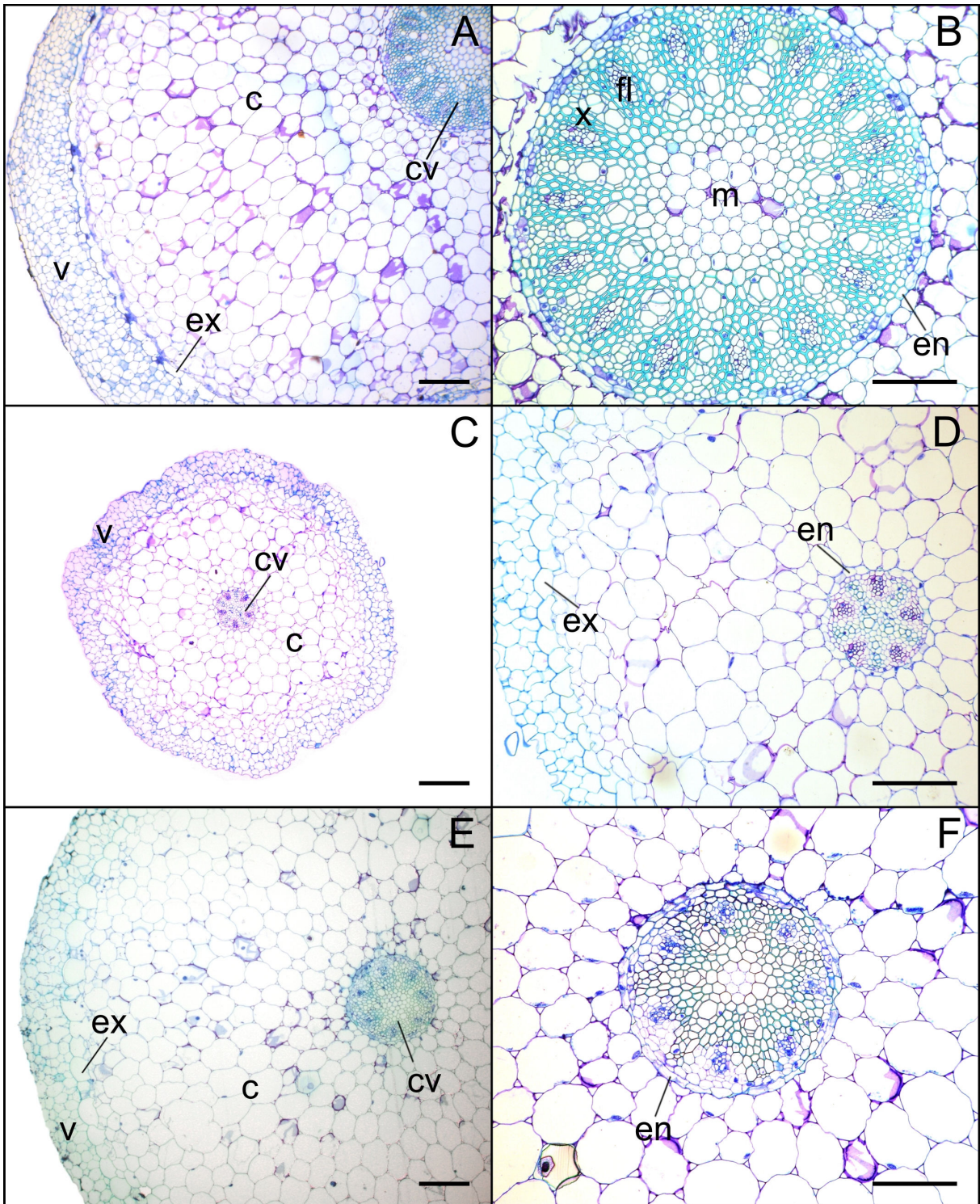


FIGURA 4.8 - Secções transversais da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A e B. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C e D. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, E e F. Planta aclimatizada. c = córtex. cv = cilindro vascular. ex = exoderme. en = endoderme. fl = floema. m = medula. x = xilema. v = velame. Barra A, C e E: 300 μ m. Barra B, D e F: 200 μ m.

Nas plantas cultivadas *in vitro*, a raiz em secção transversal, possui diâmetro reduzido. O velame passa a apresentar somente duas a três camadas e a exoderme e endoderme apresentam células com paredes pouco espessadas (Figura 4.8C-D). O cilindro vascular é muito reduzido com cinco pólos de floema e xilema envolvidos por células de paredes finas (Figura 4.8D).

As raízes das plantas aclimatizadas ainda apresentam velame com três a quatro camadas de células, mas as células da exoderme voltam a ter formato semelhante às plantas *ex vitro* e há espessamento na parede periclinal externa (Figura 4.8E). A endoderme não apresenta células de parede espessada como nas plantas *ex vitro*, somente células com leve espessamento de parede nas células próximas ao floema. O cilindro vascular é ainda reduzido com sete pólos de floema e xilema, e o floema é envolvido por células de paredes delgadas (Figura 4.8F).

As folhas da planta *ex vitro* apresentam, na epiderme da face abaxial, estômatos levemente abaixo da linha das outras células epidérmicas e com os poros alinhados paralelamente com o maior eixo da folha (Figuras 4.9A-B). No entanto, os estômatos das plantas *in vitro* são levemente projetados acima da epiderme, e o poro, aparentemente, possui maior abertura (Figuras 4.9C-D). Nas plantas aclimatizadas, a abertura do poro é relativamente grande, mas os estômatos já retornam a posição levemente abaixo da linha das outras células epidérmicas (Figuras 4.9E-F).

Em secção transversal, as folhas das plantas nos três ambientes, apresentam células epidérmicas da face adaxial maiores que as da face abaxial. Como o observado em vista frontal, os estômatos ocorrem em posição ligeiramente aprofundada nas folhas das plantas *ex vitro* (Figura 4.10A-B) e abertos e projetados acima das células epidérmicas nas folhas das plantas *in vitro* (Figura 4.10C-D). A cutícula é mais espessa nas plantas *ex vitro*, muito delgada nas plantas *in vitro* e de espessura média nas plantas aclimatizadas (Figura 4.10B, D e F). O mesofilo é homogêneo com células arredondadas e de maior tamanho na região central em todos os ambientes. Feixes de fibras estão dispostos próximos às faces adaxial e abaxial ao longo de toda a folha das plantas *ex vitro* (Figura 4.10A-B). Nas plantas *in vitro* e aclimatizadas, as folhas são mais delgadas e possuem feixes de fibras menos evidentes e com paredes mais delgadas. O mesofilo das plantas *ex vitro* possuem

células com conteúdo celular mais denso, provavelmente pela maior quantidade de cloroplastos e compostos fenólicos (Figura 4.10E-F).

Na região da nervura central das folhas das plantas *ex vitro* ocorre uma proeminência na face abaxial com feixe vascular de grande porte do tipo colateral, sendo o floema totalmente envolvido por fibras (Figura 4.10A). Já nas folhas das plantas *in vitro*, o feixe vascular da nervura central é pouco desenvolvido, com uma menor proporção de fibras ao redor do floema (Figura 4.10C), quando comparado a folhas *ex vitro*. Nas folhas das plantas aclimatizadas, a nervura central é mais proeminente que nas plantas *ex vitro* e *in vitro*. O feixe vascular nessa região ainda é menos desenvolvido que nas folhas das plantas *ex vitro*, mas apresenta mais feixes de fibras dispersos que nas plantas *in vitro*. No mesofilo de todas as plantas são observados idioblastos contendo ráfides (Figura 4.10E-F).

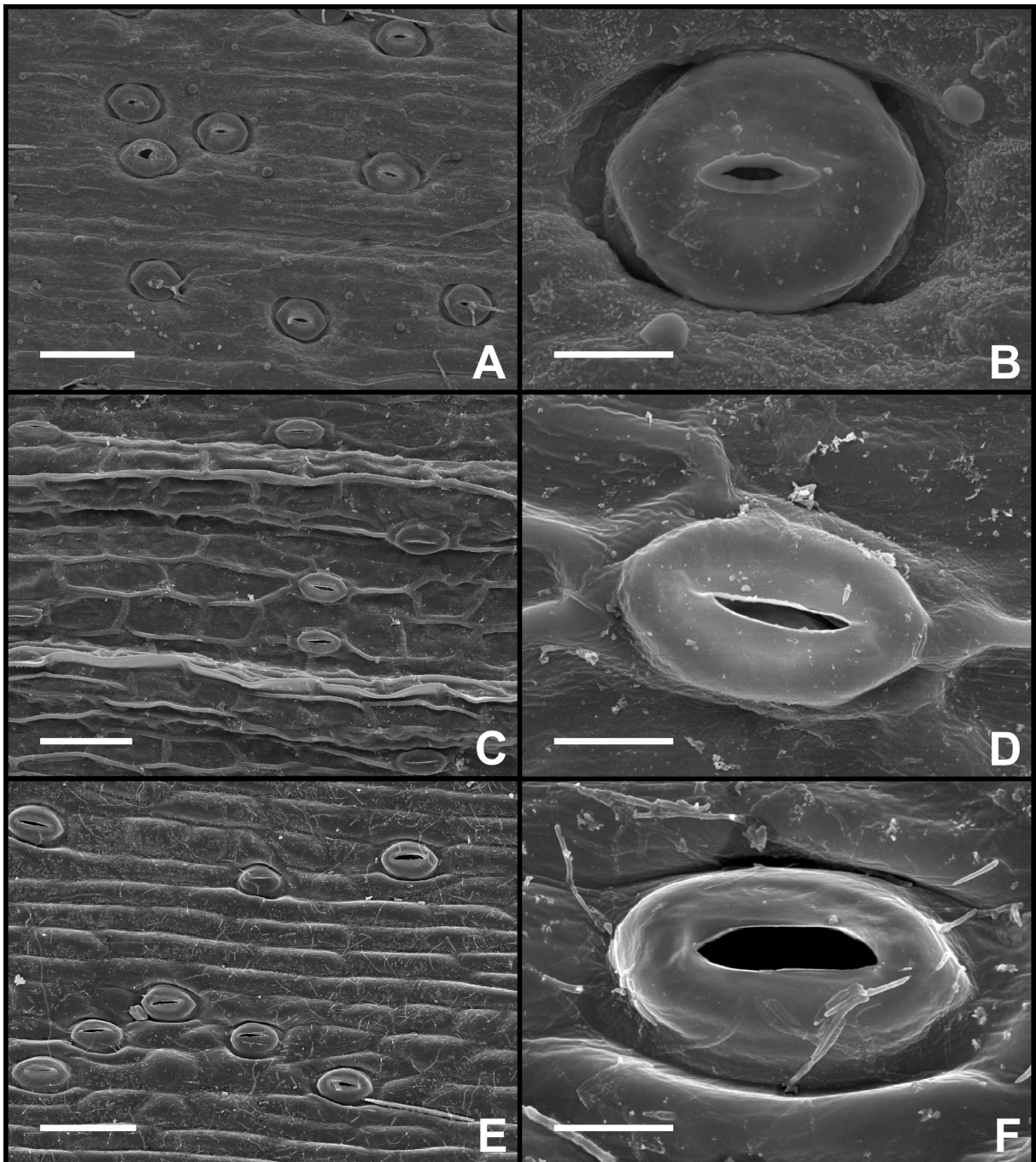


FIGURA 4.9 - Vista frontal da epiderme abaxial de folhas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. A e B. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C e D. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, E e F. Planta aclimatizada. Barra A, C e E: 2500 μm. Barra B, D e F: 50 μm.

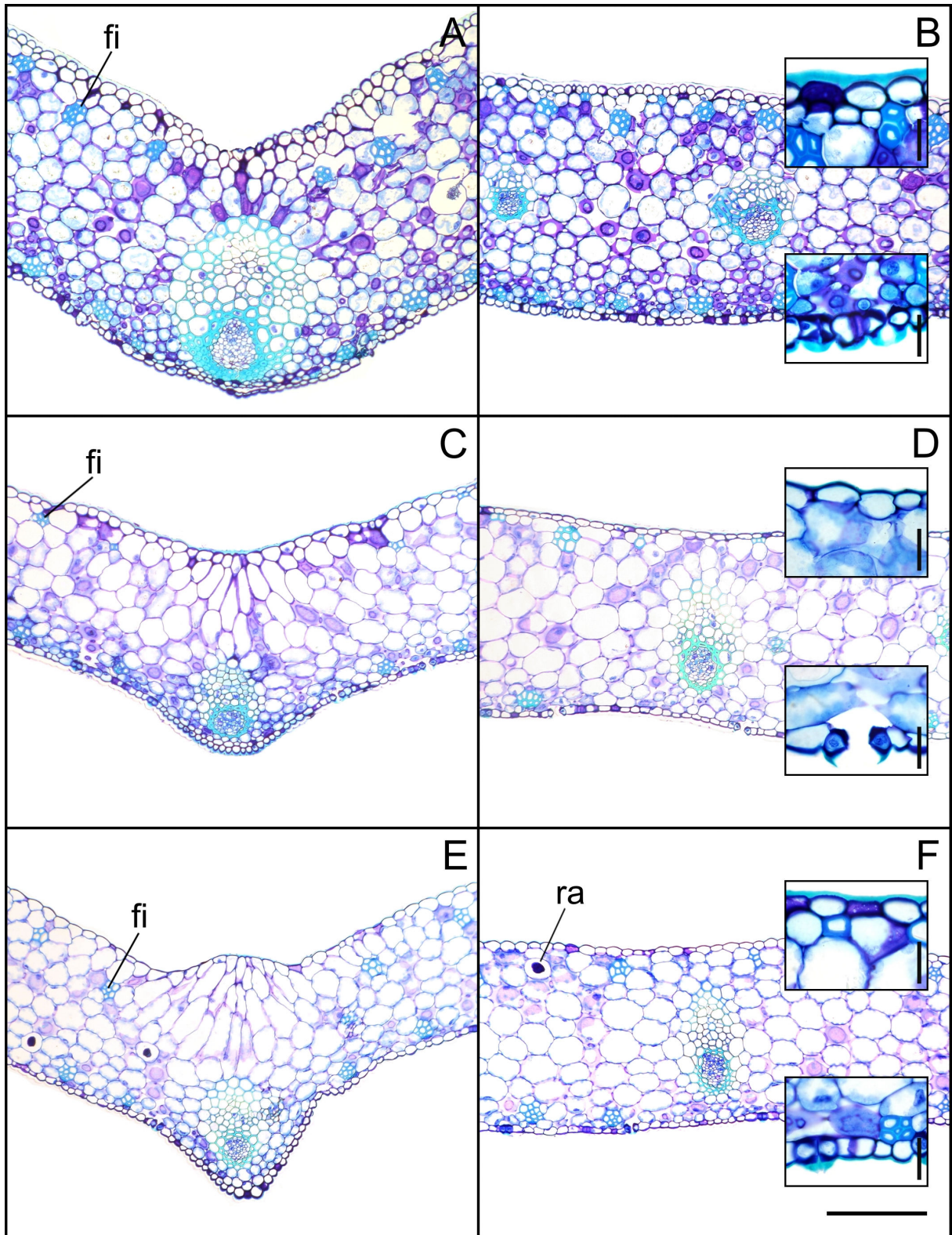


FIGURA 4.10 - Secções transversais da nervura e do limbo de *Cymbidium* 'Joy Polis'. A e B. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*, C e D. Planta cultivada no ambiente *in vitro*, E e F. Planta aclimatizada. B, D e F. Observar detalhe da epiderme de ambas as faces. fi = fibras. ra = idioblatos com ráfides Barra: 200 µm. Barra detalhe da epiderme: 25 µm.

5.4 DISCUSSÃO

Os melhores resultados obtidos no substrato fibra de coco em pó puro ou em mistura pode estar relacionado ao pH e ao teor de potássio (Tabela 4.1). Segundo KÄMPF (2000), o pH (CaCl_2) ideal para o gênero *Cymbidium* é de 5,0 a 6,0. PAN et al. (1997) citam a alta demanda de *Cymbidium* por potássio, o qual é encontrado, dentre os substratos utilizados, em maior concentração na fibra de coco em pó e na fibra de coco (Tabela 4.1).

Outro fator que pode ter contribuído para os resultados, foi os valores mais elevados da saturação por bases dos substratos vermiculita (82%), fibra de coco em pó + vermiculita (79%) e fibra de coco em pó (66%) (Tabela 4.1). De acordo com MALAVOLTA (1992), a saturação por bases é a proporção de capacidade de troca de cátions CTC ocupada por bases trocáveis, que são potássio, cálcio, magnésio e sódio. Baixa porcentagem de saturação por bases significa predominância de hidrogênio e alumínio no complexo de troca. Segundo SERRAT et al. (2002), para que o substrato seja considerado fértil, deve apresentar valores acima de 50% na saturação por bases, como foi observado nos substratos que continham fibra de coco em pó puro ou em mistura. Segundo COLOMBO (2004), a fibra de coco em pó também foi indicada para a aclimatização de mudas de *Cattleya chocolate drop* x (*C. guttata* x *L. tenebrosa*).

Apesar de o substrato Plantmax® ter apresentado um dos maiores valores de CTC e elevados teores de fósforo, cálcio, magnésio e carbono (Tabela 4.1), ele não foi adequado para aclimatização de mudas dessa cultivar (Figuras 4.2 e 4.3). KÄMPF (2000), afirma, que quanto menor o tamanho das partículas, maior será o valor da CTC. O autor ainda indica que substratos com alta CTC, porém com alta retenção de água e baixo espaço de aeração, devem ter participação limitada como substrato, principalmente para orquídeas que necessitam de 20 a 30% de espaço de aeração no substrato.

Os teores mais elevados de fósforo foram observados nos substratos que continham fibra de coco em pó puro ou em mistura e Plantmax®. De acordo com MALAVOLTA et al. (1974), o fósforo desempenha papel fundamental na respiração,

seja no deslocamento inicial da glicose, seja no armazenamento, na transferência e na utilização da energia gerada no processo.

DEMATTE e DEMATTE (1996) afirmam que o substrato recomendado para substituir o xaxim, no cultivo de orquídeas epífitas, é a fibra de coco pura ou em mistura com carvão vegetal. Já, para ASSIS (2004), o substrato adequado para o cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. foi a mistura de fibra de coco em pó com coco em cubos. SOUZA e JASMIM (2004) e SILVEIRA et al. (2002), concluíram que a utilização da fibra de coco pura ou em misturas pode reduzir os custos de produção, quando comparada com a utilização de substratos comerciais, sem prejudicar o crescimento das plantas.

Na literatura também são citados outros substratos e misturas para o cultivo de orquídeas, como vermiculita associada ao carvão para espécies nativas do Brasil, *Oncidium sarcodes* e *Shomburgkia crispa* (MORAES et al., 2002), vermiculita mais carvão e vermiculita mais casca de arroz carbonizada para *Maxillaria pictea* e vermiculita para *Oncidium baueri* (FARIA et al., 2001).

O velame presente nas raízes das orquídeas é capaz de absorver água e sais minerais, reduzir a transpiração e oferecer proteção mecânica (PRIDGEON, 1982). O número de camadas de células no velame e no córtex varia conforme a espécie (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004). No presente trabalho, o número de camadas do velame variou conforme o ambiente de cultivo. Plantas *in vitro* apresentaram drástica redução no número de camadas de células do velame, provavelmente devido à alta umidade relativa dentro do frasco.

Provavelmente devido a essa estrutura anatômica das raízes *in vitro*, nas plantas aclimatizadas novas raízes se formam e as raízes formadas *in vitro* cessam o crescimento, sendo provavelmente pouco eficientes. Concordando com o observado por PIERIK (1990), que afirmou que as raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais.

A disposição alinhada dos estômatos também foi registrada por SILVA e MILANEZE-GUTIERRE (2004) em *Cattleya walkeriana*. A presença de estômatos apenas na face da epiderme abaxial é muito comum para a família Orchidaceae (PRIDGEON, 1982; OLIVEIRA e SAJO, 1999; SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004).

De acordo com ESAU (1977), o crescimento e a organização da lâmina foliar sofrem grande influência de fatores ambientais como a temperatura, a intensidade luminosa e a disponibilidade de água. A plasticidade fenotípica, que é uma propriedade do genótipo, é a capacidade da planta de alterar seu desenvolvimento em resposta à mudança ambiental. Alterações fenotípicas relacionadas à limitação de recurso representam uma resposta às condições adversas e podem ser uma vantagem para o organismo (WELLS e PIGLIUCCI, 2000). Plantas anfíbias apresentam plasticidade fenotípica que permite a sobrevivência destas tanto estando submersas como emersas (SCULTHORPE, 1967). Segundo WELLS e PIGLIUCCI (2000), as folhas destas plantas, quando submersas, apresentam redução do sistema vascular e da espessura do mesofilo e da cutícula se comparadas às folhas das plantas emersas.

Na cultura *in vitro*, as plantas estão submetidas a um ambiente com elevada umidade relativa e baixa intensidade luminosa. Estas condições ambientais levaram a alterações morfo-anatômicas nas plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Houve diferença na deposição de cutícula em ambas as faces da epiderme das folhas nas plantas *ex vitro*, *in vitro* e aclimatizadas. Similarmente, em *Liquidambar styraciflua* L., a cutícula foi reduzida nas plantas *in vitro*, quando comparada às plantas *ex vitro* (WETZSTEIN e SOMMER, 1982). Para POSPÍŠILOVÁ et al. (1999), as alterações mais importantes nas plantas durante a aclimatização são o desenvolvimento da cutícula e de estômatos funcionais.

Estômatos levemente projetados e abertos como os observados nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, também ocorreram em cultura de *Rubus idaeus* (DONNELLY e VIDAVER, 1984). Durante a aclimatização, os estômatos das folhas de *Cymbidium* 'Joy Polis' retornaram à posição levemente abaixo das células epidérmicas, o que é característico em ambientes com menor grau de umidade. JOHANSSON et al. (1992) verificaram a mesma alteração em plantas de *Rosa* cultivadas *in vitro*. Essa característica provavelmente se deve à maior umidade do ambiente *in vitro*, o que também é registrado em plantas aquáticas (SCULTHORPE, 1967; BONA, 1999).

Os feixes vasculares observados nas folhas são colaterais com fibras envolvendo o floema. O mesmo foi observado em várias espécies por PRIDGEON (1982), OLIVEIRA e SAJO (1999) e SILVA e MILANEZE-GUTIERRE (2004). Feixes

de fibras dispersos no mesofilo também foram encontrados em espécies com folhas coriáceas, porém não observadas em orquídeas de folhas membranáceas, o que difere do observado nesse trabalho para *Cymbidium*, no qual as folhas são membranáceas com a presença de feixes de fibras no mesofilo.

Os feixes vasculares das plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas apresentaram-se mais reduzidos que os das plantas *ex vitro*. Essa característica também foi registrada em folhas de *Rollinea mucosa*, nas quais o sistema vascular apresentou um reduzido número de elementos condutores (ALBARELLO et al., 2001). Segundo esses autores, apesar dessa alteração nas plantas *in vitro*, elas são aptas a passar pelo processo de aclimatização. A redução do tecido vascular, especialmente o xilema, é uma característica típica de plantas de ambientes úmidos (SCULTHORPE, 1967).

Algumas dicotiledôneas, como o *Liquidambar styraciflua* L., quando cultivadas *in vitro*, deixam de apresentar diferenciação entre os parênquimas paliádico e lacunoso (WETZSTEIN e SOMMER, 1982). Em *Rollinea mucosa*, essa organização é mantida, fato que, segundo os autores, favorece a fase de aclimatização (ALBARELLO et al., 2001), já que essa etapa não foi alcançada no caso de *Liquidambar styraciflua*. Em *Cymbidium* 'Joy Polis' o parênquima é homogêneo, mas foi possível observar uma redução na espessura do limbo.

A estrutura anatômica das plantas aclimatizadas de *Cymbidium* 'Joy Polis' possui mais características semelhantes a da planta *ex vitro* (matriz), demonstrando a capacidade de adaptação desta planta ao novo ambiente. Segundo POSPÍŠILOVÁ et al. (1999), as alterações morfo-anatômicas e fisiológicas das plantas cultivadas *in vitro* podem ser revertidas durante a aclimatização, sendo que algumas espécies necessitam de uma mudança gradual das condições ambientais.

5.5 CONCLUSÃO

O substrato mais indicado para a aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis', nessas condições experimentais, foi a fibra de coco em pó + fibra de coco, por apresentar bons resultados de ganho de massa fresca e pelo seu baixo custo. Pelas alterações anatômicas observadas, as plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' possuem grande capacidade de adaptação ao ambiente, sendo provavelmente este um dos fatores responsáveis pela sobrevivência das mudas durante a aclimatização.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 35-46, 2001.

ASSIS, A. M. de **Utilização de substratos a base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. Londrina, 2004. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

BATCHELOR, S. R. Orchid culture – 6 – watering. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 50, n. 8, p. 945-952, 1981.

BEGUM, A. A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, vol. 63, n. 3, p. 663-673, 1994.

BONA, C. **Adaptações morfo-anatômicas dos órgãos vegetativos de *Bacopa salzmanii* (Benth.) Wettst. ex Edwall e *Bacopa monnierioides* (Chom.) Robinson (Scrophulariaceae) em ambiente terrestre e aquático**. São Paulo, 1999. 193 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO₂. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, p. 388-392, 1982.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S. de; MAKISHIMA, N. Fibra do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20 (4), p. 533-535, 2002.

COLOMBO, L. A. **Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob sistemas de irrigação**. Londrina, 2004. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 1998. p. 63-67

DEMATTÊ, J. B. J.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudos hídricos com substratos vegetais para o cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 11, p. 803-813, 1996.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER, E. S.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 225-232, 1995.

DHAWAN, V.; BHOJWANI, S. S. Hardening *in vitro* and morphophysiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Science**, v. 53, p. 65-72, 1987.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p. 172-176, 1984.

ESAU, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher, São Paulo, 2ª ed., 293 p.

FARIA, R. T. de; REGO, L. do V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of different genotypes of brazilian orchid cultivation in alternative substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p. 337-342, 2001.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P.. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; FRÁGUAS, C. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'MARUBAKAIDO'. **Ciência Agrotecnológica**, v. 25, p. 462-467, 2001.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. MacGraw-Hill Book Co, New York.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E. C.; ROBARDS, A. W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 66, p. 165-176, 1992.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 254p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088 p.

MALAVOLTA, E. **ABC da Análise de Solos e Folhas**. São Paulo: Editora Agronômica CERES, 1992. 124 p.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H. P.; BRASIL SOBRINHO, M. O. C.; MELLO, F. A. F. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Pioneira, 1974. 727 p.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24 (5), p. 1397-1400, 2002.

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

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

PAN, R. C.; YE, Q. S.; HEW, C. S. Physiology of *Cymbidium sinense*: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 70, p. 123-129, 1997.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3^a ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic of anatomical characters in the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 921-938, 1982.

REUTHER, G. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. Propagation of ornamentals. **Acta Horticulturae**, v. 226, p. 91-97, 1988.

RODRIGUES, P. H. V.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B.; DUTRA, M. de F. B. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Scientia Agrícola**, v. 62, n. 3, p. 299-301, 2005.

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. New York: St. Martin's Press, 1967. 610p.

SERRAT, B. M.; LIMA, M. R. de; GARCIAS, C. E.; FANTIN, E. R.; CARNIERI, I. M., PINTO, L. S. **Conhecendo o solo**. Curitiba:UFPR/Setor de Ciências Agrárias/Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, 2002. 28p.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, p. 468-472, 1990.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; DUTRA, L. F. BAP e substrato na aclimatização de plântulas de glóxinia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência Agrotecnológica**, v. 27, p. 255-260, 2003.

SILVA, C. I. da; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2004.

SILVA, F. S. C.; SILVA, S. P. C. O substrato na cultura das orquídeas, sua importância, seu envelhecimento. **Orquidário**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 03-10, 1997.

SILVEIRA, E. B.; RODRIGUES, V. J. L. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; MESQUITA, J. C. P. Pó de coco como substrato para a produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 211-216, 2002.

SOUZA, N. A. de; JASMIM, J. Crescimento de singônio com diferentes tutores e substratos a base de mesocarpo de coco. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2004.

SUTTER, E. G. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 55, p. 321-329, 1985.

SUTTER, E. G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, n. 2, p. 234-138, 1988.

SUTTER, E. G.; SHACKEL, K.; DÍAZ, J. C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae**, v. 314, p. 115-119, 1992.

WENDLING, I.; GATTO, A. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. 166p.

WELLS, C. L.; PIGLIUCCI, M. Adaptative phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. Perspectives in **Plant Ecology. Evolution and Systematics**, v. 3/1, p. 1-18, 2000.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, 1982.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica utilizada de cultivo de discos de PLBs mostrou-se eficiente, tanto com a utilização de BAP como de ANA combinado ao BAP, podendo ser utilizada para a multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis' em larga escala. A escolha do fitorregulador deve levar em conta as diferenças encontradas nesse trabalho, como uma maior regeneração de novos PLBs (9,95) com a utilização de BAP ao invés de ANA combinado ao BAP (7,03). Porém, os PLBs cultivados em meio de cultura com BAP, requerem a transferência para meio de cultura sem fitorregulador para desenvolver plantas, ao contrário do observado nos meios de cultura com ANA mais BAP. Nestes últimos meios, os PLBs formados desenvolvem-se e enraízam no mesmo meio de cultura, reduzindo o custo do processo.

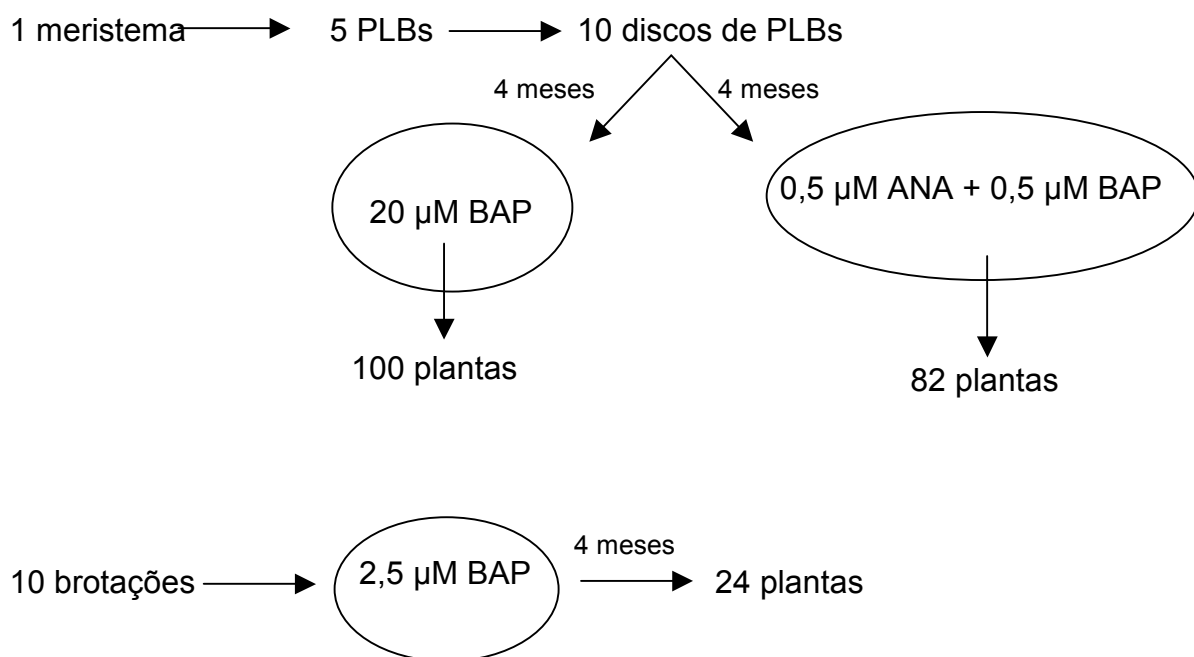
A utilização dos diferentes fitorreguladores em diferentes concentrações, não alterou a origem anatômica dos PLBs, nem o tempo necessário para sua formação. Contrariamente ao descrito na literatura consultada para a embriogênese somática, os PLBs apresentaram conexão vascular com o explante, a qual posteriormente é desfeita pela formação de uma zona de abscisão.

A multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis' a partir de brotações não foi eficaz do modo como foi testada neste trabalho. Portanto, seria interessante testar outras citocininas e outras concentrações. Além de outros tipos de tecidos para iniciar a cultura.

A aclimatização de mudas micropropagadas de *Cymbidium* 'Joy Polis', não apresentou dificuldades, provavelmente devido à capacidade de adaptação morfológica e anatômica.

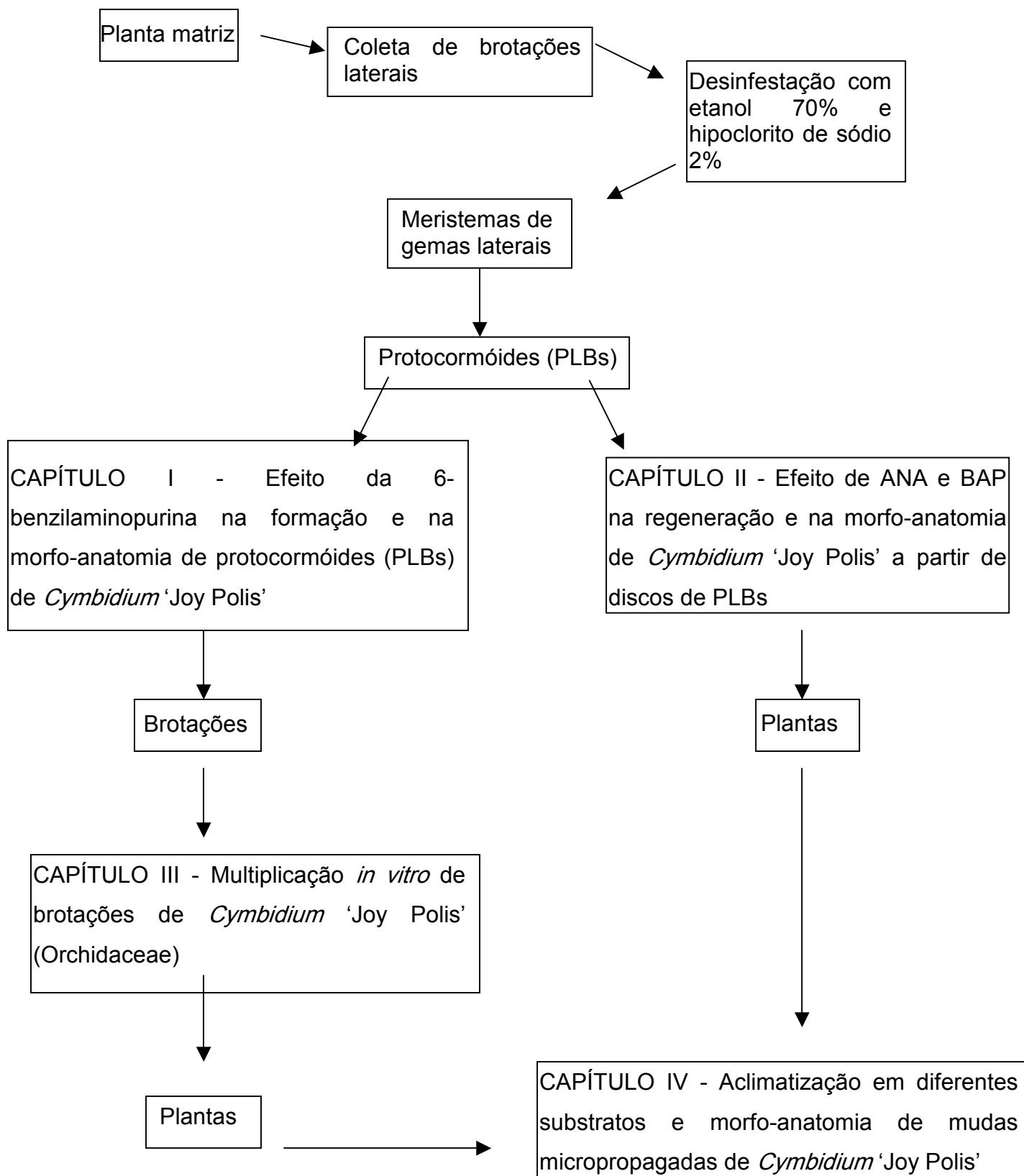
O estudo anatômico do desenvolvimento do PLB, a partir de diferentes explantes e em diferentes espécies de orquídeas, seria interessante para verificar a ocorrência ou não da conexão vascular do PLB com o tecido de origem e a instalação da camada de abscisão, além da presença do coleóptile.

Os três métodos de multiplicação de *Cymbidium* 'Joy Polis' estão ilustrados no esquema abaixo, no qual pode-se observar sua eficiência pelo número de plantas que podem ser produzidas num mesmo período de tempo:



ANEXO

ANEXO 1. Síntese da metodologia do presente trabalho de anatomia e morfogênese *in vitro* de *Cymbidium* 'Joy Polis' (Orchidaceae).



ANEXO 2. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável número de PLBs por explante sob diferentes concentrações de BAP.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	4	67,40**
Erro Experimental	20	0,33
Total	24	
Qui-quadrado (χ^2)	9,262 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	10,73	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 3. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável número de brotações por explante sob diferentes concentrações de BAP.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	4	0,24**
Erro Experimental	20	0,01
Total	24	
Qui-quadrado (χ^2)	1,07 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	3,09	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 4. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável número de plantas por explante sob diferentes concentrações de BAP.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	4	2,27**
Erro Experimental	20	0,01
Total	24	
Qui-quadrado (χ^2)	4,48 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	28,34	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 5. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável altura média das brotações por explante sob diferentes concentrações de BAP.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	4	1,23**
Erro Experimental	20	0,006
Total	24	
Qui-quadrado (χ^2)	3,07 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	14,92	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 6. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável porcentagem de explantes necróticos sob diferentes concentrações de BAP.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	4	410**
Erro Experimental	20	28
Total	24	
Qui-quadrado (χ^2)	0,22 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	44,10	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 7. Análise de variância e Teste de Bartlett para o número médio de PLBs formados por explante, número médio de plantas, altura média das plantas e a porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 90 dias sob iluminação.

FV	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		PLBs/explante	Plantas/explante	Altura das plantas	Explantes necróticos (%)
BAP	1	1,11*	0,72*	0,00 ^{ns}	12,50 ^{ns}
ANA	3	4,75**	0,23 ^{ns}	0,042 ^{ns}	1070,83**
BAPxANA	3	3,20**	0,05 ^{ns}	0,25**	20,83 ^{ns}
ERRO	24	0,17	0,14	0,07	72,92
CV (%)		18,16	22,30	22,10	41,40
Qui-quadrado (χ ²)		3,36 ^{ns}	7,43 ^{ns}	8,31 ^{ns}	4,99 ^{ns}

n.s. não significativo

* significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

FV Fator de variação

CV Coeficiente de variação

ANEXO 8. Análise de variância e Teste de Bartlett para o número médio de PLBs formados por explante, número médio de plantas, altura média das plantas e a porcentagem de explantes necróticos de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivados em meio de cultura MS acrescido de ANA isolado ou combinado ao BAP após 30 dias no escuro e 60 dias sob iluminação.

FV	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		PLBs/explante	Plantas/explante	Altura das plantas	Explantes necróticos (%)
BAP	1	11,15**	0,34**	0,35**	12,50 ^{ns}
ANA	3	3,67**	0,38**	0,08**	737,50**
BAPxANA	3	23,91**	0,22**	0,04**	4,17 ^{ns}
ERRO	24	0,17	0,01	0,01	31,25
CV (%)		11,84	7,74	6,56	35,78
Qui-quadrado (χ^2)		11,37 ^{ns}	7,91 ^{ns}	3,33 ^{ns}	1,38 ^{ns}

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

FV Fator de variação

CV Coeficiente de variação

ANEXO 9. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável número de brotações por explante sob diferentes concentrações de BAP isolado ou combinado ao AIB.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	6	0,93**
Erro Experimental	21	0,22
Total	27	
Qui-quadrado (χ^2)	7,46 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	25,92	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 10. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável porcentagem de crescimento da brotação inicial sob diferentes concentrações de BAP isolado ou combinado ao AIB.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	6	906,9**
Erro Experimental	21	143,14
Total	27	
Qui-quadrado (χ^2)	5,554 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	21,44	

n.s. não significativo

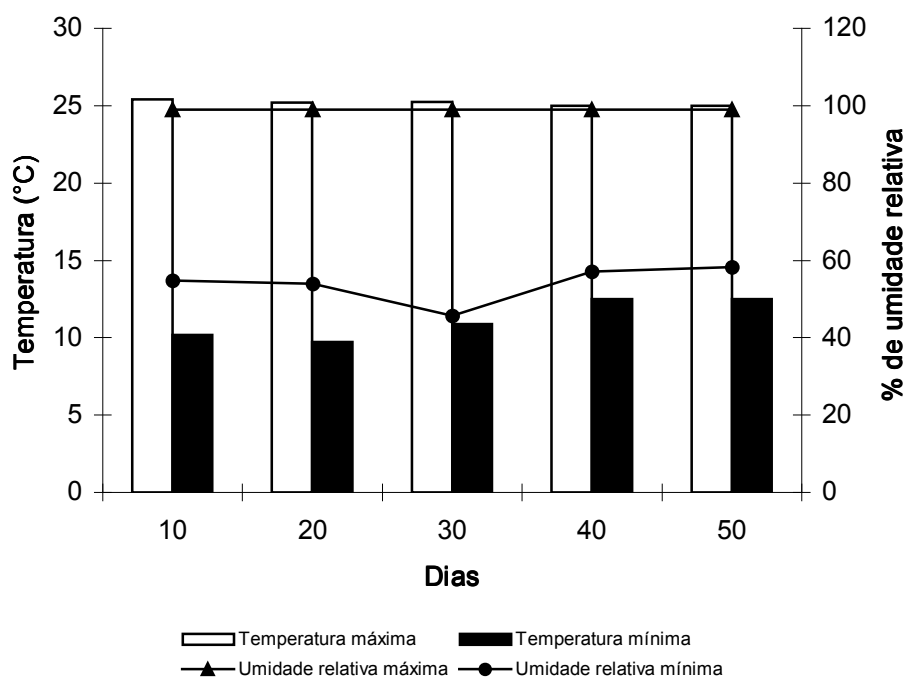
** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 11. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável comprimento médio das brotações laterais sob diferentes concentrações de BAP isolado ou combinado ao AIB.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	6	1,15**
Erro Experimental	21	0,13
Total	27	
Qui-quadrado (χ^2)	16,47 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	31,13	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade



ANEXO 12. Médias de temperatura e umidade mínimas e máximas durante o experimento de aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis'.

ANEXO 13. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável ganho na massa fresca na aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	9	5549,66**
Erro Experimental	30	81,92
Total	39	
Qui-quadrado (χ^2)	11,36 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	14,08	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 14. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável número médio de raízes na aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	9	0,96**
Erro Experimental	30	0,09
Total	39	
Qui-quadrado (χ^2)	11,16 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	11,23	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade

ANEXO 15. Análise de variância e Teste de Bartlett para a variável comprimento médio das 3 maiores raízes na aclimatização de mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes substratos após 45 dias.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamentos	9	2,10**
Erro Experimental	30	0,08
Total	39	
Qui-quadrado (χ^2)	9,03 ^{ns}	
Coeficiente de Variação (%)	12,20	

n.s. não significativo

** significativo a 1% de probabilidade