

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS

SISTEMA REPRODUTIVO, BANCO DE SEMENTES E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Brasiliorchis* R.B.SINGER *et al.*, *Christensonella* SZLACH. *et al.*, *Maxillariella* M.A.BLANCO & CARNEVALI E *Mormolyca* FENZL.

CURITIBA
2013

SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS

SISTEMA REPRODUTIVO, BANCO DE SEMENTES E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Brasiliorchis* R.B.SINGER *et al.*, *Christensonella* SZLACH. *et al.*, *Maxillariella* M.A.BLANCO & CARNEVALI E *Mormolyca* FENZL.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana L. F. Ribas
Coorientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt
Coorientador: Prof. Dr. André Andrian Padial

CURITIBA
2013

Santos, Silvia Almeida dos

Sistema reprodutivo, banco de sementes e propagação *in vitro* de *Brasiliorchis* R. B. SINGER *et al.*, *Christensonella* SZLACH. *et al.*, *Maxillariella* M. A. BLANCO & CARNEVALI e *Mormolyca* FENZL.
/ Silvia Almeida dos Santos - Curitiba, 2013.

88 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Luciana L. F. Ribas

Coorientador: Professor Dr. Eric de Camargo Smidt

Coorientador: Professor Dr. André Andrian Padial

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Paraná. 2013.

Inclui bibliografia

1. Polinização. 2. Germinação. 3. *Micropropagação*. 4. Transplântio. I. Ribas, Luciana L. F.
II. Smidt, Eric de Camargo. III. Padial, André Andrian. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 584.15



281^a.
2013

Ata de Julgamento da Dissertação de Mestrado da pós-graduanda **SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS**. Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de 2013, às quatorze horas na Sala 421, no Bloco da Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na presença da Comissão Examinadora, composta pelos Professores Doutores Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR) presidente e orientadora, Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR) e Luiz Antonio Biasi (UFPR) como titulares, foi aberta a sessão de julgamento da Dissertação intitulada: “**Sistema reprodutivo, banco de sementes e propagação *in vitro* de *Brasiliorchis* R.B. Singer et al., *Christensonella* Szlach. et al., *Maxillariella* M. A. Blanco & Carnevali e *Mormolyca* Fenzl.**” Após a apresentação, perguntas e esclarecimentos acerca da Dissertação, a Comissão Examinadora **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO DA ALUNA SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS**. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão da qual foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

Prof^a Dr^a Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

Prof^a Dr^a Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)

Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi (UFPR)



Título: Mestre em Ciências Biológicas - Área de Botânica.

Dissertação: "Sistema reprodutivo, banco de sementes e propagação *in vitro* de *Brasiliorchis* R.B. Singer et al., *Christensonella* Szlach. et al., *Maxillariella* M. A. Blanco & Carnevali e *Mormolyca* Fenzl."

Candidata: SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS

Titulares: Prof^ª Dr^ª Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)- PRESIDENTE
Prof^ª Dr^ª Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)
Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi (UFPR)

Suplente: Prof^ª Dr^ª Erika Amano (UFPR)

Parecer: A Comissão Examinadora, reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, analisando o conteúdo, a forma, a apresentação e a defesa da Dissertação, APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO DA ALUNA SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS. É de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação, após as correções sugeridas.

A candidata tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

OBS.: O grau de Mestre fica condicionado à comprovação de ter submetido pelo menos um artigo para publicação em revista técnico-científica com corpo editorial, bem como a entrega da versão definitiva da Dissertação, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, a contar desta data.

Curitiba, 27 de agosto de 2013

Prof^ª Dr^ª Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

Prof^ª Dr^ª Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)

Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi (UFPR)

Ciente Candidata



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**“Sistema reprodutivo, banco de sementes e propagação
in vitro de *Brasiliorchis* R.B. Singer et al.,
Christensonella Szlach. et al., *Maxillariella* M. A. Blanco
& Carnevali e *Mormolyca* Fenzl.”**

por

SILVIA ALMEIDA DOS SANTOS

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores**

Profª Drª Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)- PRESIDENTE

Profª Drª Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)

Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi (UFPR)

Curitiba, 27 de agosto de 2013.

Dedico este trabalho a minha mãe, Scheila de Almeida dos Santos, por ter vencido sua batalha contra o câncer e sempre estar ao meu lado me mostrando que as dificuldades nunca são maiores do que a nossa força de vontade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que de certa forma participaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Primeiramente a Deus, por guiar meus passos e trazer sempre algo de especial aos dias mais difíceis.

Agradeço a minha família pelo suporte e o carinho de sempre. A meu namorado pelo amor incondicional, abraços e surpresas que trouxeram luz aos meus dias ruins. Também agradeço aos meus orientadores pelo conhecimento adquirido e aos meus colegas de laboratório por mostrar que uma equipe de trabalho pode ser algo muito maior do que pessoas que trabalham no mesmo lugar, mas pessoas que estão umas ao lado das outras para qualquer situação, trazendo alegria a qualquer momento.

À equipe do Orquidário Dr. Frederico Carlos Hoehne, de São Paulo, pela permissão a utilização das plantas utilizadas neste trabalho e pelo suporte técnico oferecido.

Ao projeto Orchid Seed Storage for Sustainable Use (OSSSU), no qual este projeto está inserido.

Ao Programa Nacional de Apoio e desenvolvimento da Botânica (PNADB-CAPES) pela concessão da bolsa.

“Se quer viver uma vida feliz,
amarre-se a uma meta, não a
pessoas nem a coisas”.

Albert Einstein

RESUMO

Orchidaceae A. Juss. é uma das famílias mais representativas dentre as Angiospermas. É constituída de flores ornamentais e de corte, de grande beleza que corre risco de extinção, devido às coletas predatórias e por seu grande potencial econômico. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer estratégias para micropropagação e conservação *ex situ* de plantas pertencentes aos gêneros *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Maxillariella* e *Mormolyca*. Foi analisada a biologia reprodutiva das espécies a partir de polinização manual, observando-se que a formação de tubos polínicos compatíveis ocorreu somente nas flores com polinização cruzada e para autopolinização houve a formação de tubos polínicos irregulares, com ou sem formação de calose. Nas flores autopolinizadas ocorreu queda das flores impedindo a formação de fruto e sementes. As sementes foram armazenadas a -20°C e -80°C, por 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Para avaliar a viabilidade das sementes foi utilizado o teste do tetrazólio (TTZ), constatando-se que sementes não armazenadas apresentaram resultados superiores quando comparadas com as sementes armazenadas. A temperatura de -20°C pode ser indicada para o armazenamento de sementes de *M. robusta* e *B. schunkeana* e de -80°C para *B. picta* e *M. rufescens*. Sementes recém-colhidas e armazenadas de *Brasiliorchis picta* e *B. schunkeana* foram germinadas nos meios KC, MS, MS/2 e WPM. Para ambas as espécies, a porcentagem de germinação foi mais alta em sementes sem armazenamento, seguida das armazenadas a -20°C e os melhores meios de cultura foram MS e WPM. Recomenda-se o meio WPM para a germinação *in vitro* por permitir crescimento e vigor das plântulas, sem que ocorra mortalidade. As plântulas de *B. picta* foram aclimatizadas com sucesso com o uso de vermiculita como substrato. Para a micropropagação das espécies *Mormolyca rufescens* e *Brasiliorchis picta* foram utilizadas folhas inteiras e TCLts (“thin cell layer” transversal) apicais, medianos e basais. Os explantes foram cultivados em meio MS/2, contendo BAP (2,5; 5,0 e 10 µM) ou TDZ (3, 6 e 9 µM) durante 90 dias. Os resultados indicaram que ocorreu regeneração direta de PLBs nos explantes foliares, com maior frequência para *B. picta* do que para *M. rufescens*. As folhas inteiras de *M. rufescens* e TCLts das duas espécies apresentaram maiores porcentagens de regeneração de PLBs em meio contendo 9 µM de TDZ. A região basal dos explantes foliares foi a mais responsiva. A técnica TCLt é promissora para a propagação clonal de *B. picta* e *M. rufescens*.

Palavras-chave: polinização, germinação, micropropagação, transplântio.

ABSTRACT

Orchidaceae A. Juss. is one of the most representative families among the Angiosperms. It is constituted of ornamental and cut flowers, which are endangered for their beauty due to predatory picking and great economic potential. The main objective of this work was to establish strategies for ex situ conservation of plants belonging to *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Maxillaria* and *Mormolyca* genera. The reproductive biology of species was analyzed through manually pollination, when it was observed that the formation of compatible pollinic tubes only occurred in flowers after crossed-pollination and after auto-pollination, the formation of irregular pollinic tubes was observed, with or without callus formation. In self-pollinated flowers, the flowers failed and blocked the formation of the fruit and seeds. The seeds were stored at -20°C and -80°C, for 1, 3, 6, 9 and 12 months. Seed viability was evaluated by the tetrazolium test (TZ), and it was observed that non-storing seeds showed better results when compared to stored seeds. The temperature of -20°C can be indicated for the storage of the seeds of *M. robusta* and *B. schunkeana*, and -80°C to store *B. picta* and *M. rufescens*. Freshly harvested and stored seeds of *Brasiliorchis picta* and *B. schunkeana* were germinated on KC, MS, MS/2 and WPM culture media. For both species, the percentage of germination was higher in non-storing seeds, followed by the stored ones in -20°C and the best media for culture were MS and WPM. WPM is recommended for *in vitro* germination allowing the growth and vigor of seedlings, without the occurrence of mortality. The seedlings of *B. picta* were acclimatized with success with the use of vermiculite as substrate. For micropropagation *Mormolyca rufescens* and *Brasiliorchis picta* species were utilized whole leaves and apical, median and basal TCLts. The explants were cultivated on MS/2 medium, containing BAP (2.5; 5.0 and 10 µM) or TDZ (3, 6 and 9 µM) during 90 days. The results indicated that direct regeneration of PLBs in the foliar explants, occurred with higher frequency for *B. picta* than for *M. rufescens*. The whole leaves of *M. rufescens* and TCLts of both species showed larger percentage of regeneration of PLBs in medium containing 9 µM TDZ. The basal region of the foliar explants was the most responsive one. The TCLt technique is promising for clonal propagation of *B. picta* and *M. rufescens*.

Key-words: pollination, germination, micropropagation, transplanting.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1 - VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis picta*, *Brasiliorchis schunkeana*, *Mormolyca rufescens* E *Maxillariella robusta* AVALIADAS PELO TESTE DO TETRAZÓLIO.....27

CAPÍTULO 2

- FIGURA 2 - SEMENTES DE *Brasiliorchis picta* GERMINADAS A 60 DIAS NOS MEIOS DE CULTURA: A- KC (-20°C); B- KC (-80°C); C- MS (-20°C); D- MS (-80°C); E- MS/2 (-20°C); F- MS/2 (-80°C); G- WPM (-20°C); H- WPM (-80°C). BARRAS = 0,5 cm.....50
- FIGURA 3 - SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana* GERMINADAS A 60 DIAS NOS MEIOS DE CULTURA: A- KC (-20°C); B- KC (-80°C); C- MS (-20°C); D- MS (-80°C); E- MS/2 (-20°C); F- MS/2 (-80°C); G- WPM (-20°C); H- WPM (-80°C). BARRAS = 0,5 cm.....53

CAPÍTULO 3

- FIGURA 4 - POSIÇÃO DAS SEÇÕES DE TCLt ("THIN CELL LAYER"), MEDINDO APROXIMADAMENTE 1 MM DE ESPESSURA, REALIZADOS NAS FOLHAS DE *Brasiliorchis picta* e *Mormolyca rufescens*, MEDINDO ATÉ 1 CM DE COMPRIMENTO, APÓS 3 MESES DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*. **B1 E B2** - BASE DA FOLHA, **M1 E M2**- PARTE MEDIANA DA FOLHA, **A1 E A2** - ÁPICE DA FOLHA.....69
- FIGURA 5 - PLBs REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Brasiliorchis picta* A- FOLHA INTEIRA, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2; B- SEÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2; C- SEÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 3µM DE TDZ; D- SEÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 9µM DE TDZ; E- SEÇÃO A2, APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 10µM DE BAP; F- SEÇÃO B2, APÓS 60 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 9µM DE TDZ; G- SEÇÃO B2 APÓS 75 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 µM DE TDZ; H- SEÇÃO B1 APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 10 µM DE BAP. BARRA= 1000 µm.....74
- FIGURA 6 - FIGURA 3- PLBs REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Mormolyca rufescens* A- FOLHA INTEIRA, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5 µM DE BAP; B- SEÇÃO B1, APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2; C- SEÇÃO B2 APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMETADO COM 2,5 µM DE BAP; D- SEÇÃO A2 APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMETADO COM 6 µM DE TDZ; E- SEÇÃO B1 APÓS 60 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 3 µM DE TDZ; F- SEÇÃO A1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 µM DE TDZ; G- SEÇÃO A2, APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 µM DE TDZ; H- FOLHA INTEIRA APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5 µM DE BAP. BARRA= 1000 µm.....78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 -	ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS ORIGINADAS DE AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA, FIXADAS EM FAA 70% PARA OBSERVAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS.....	23
TABELA 2 -	DESENVOLVIMENTO OU NÃO DE TUBOS POLÍNICOS EM <i>Brasiliorchis picta</i> , <i>Brasiliorchis marginata</i> , <i>Brasiliorchis ubatubana</i> , <i>Christensonella paranaensis</i> , <i>Christensonella subulata</i> E <i>Mormolyca rufescens</i> EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA.....	26

CAPÍTULO 2

TABELA 1 -	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i> , SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C.....	48
TABELA 2 -	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i> , SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -80°C.....	49
TABELA 3 -	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis schunkeana</i> , SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C.....	51
TABELA 4 -	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis schunkeana</i> , SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -80°C.....	52
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PLÂNTULAS DE <i>B. picta</i> MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, APÓS 90 DIAS.....	54

CAPÍTULO 3

TABELA 1 -	EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE <i>Brasiliorchis picta</i> , APÓS 90 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS/2, ACRESCIDO DE CITOCININAS.....	71
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DOS EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs A PARTIR DE TCLTS FOLIARES DE <i>Brasiliorchis picta</i> . CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.....	72
TABELA 3 -	AVALIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE PLBs REGENERADOS POR EXPLANTE A PARTIR DE TCLTS FOLIARES DE <i>Brasiliorchis picta</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.....	73
TABELA 4 -	EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE FOLHA DE <i>Mormolyca rufescens</i> , CULTIVADA EM MEIO MS/2, ACRESCIDO DE CITOCININAS, APÓS 90 DIAS.....	75
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DOS EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs A PARTIR DE TCLTS DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Mormolyca rufescens</i> . CULTIVADAS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.....	75
TABELA 6 -	AVALIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE PLBs REGENERADOS POR EXPLANTE A PARTIR DE TCLTS FOLIARES DE <i>Mormolyca rufescens</i> . CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	- 6-benzilaminopurina
FAA	- Solução de formol + ácido acético + etanol
IBOT-SP	- Instituto de Botânica de São Paulo
KC	- Knudson (1946)
MS	- Murashige & Skoog (1962)
MS/2	- Murashige & Skoog com sais reduzidos pela metade
OSSSU	- "Orchid Seed Storage for Sustainable Use"
PLBs	- Protocormóides ("protocorm like body")
TCL	- Camada fina de células ("thin cell layer")
TDZ	- Tiazuron
TZ	- Tetrazólio
WPM	- Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1980)
TCLt	- "Thin cell layer" transversal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERENCIAS	14
CAPÍTULO I – EVOLUÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO E CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES DE <i>Brasiliorchis</i> R. B. Singer et al., <i>Christensonella</i> Szlach. et al., <i>Maxillariella</i> M. A. Blanco & Carnevali E <i>Mormolyca</i> Fenzl (Orchidaceae)	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO.....	21
2.2 POLINIZAÇÃO.....	21
2.3 ANÁLISE DE TUBOS POLÍNICOS	21
2.4 COLETA, ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES....	24
3 RESULTADOS	25
3.1 ANÁLISE DE TUBOS POLÍNICOS	25
3.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES PELO TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ).....	26
4 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO	30
REFERENCIAS	31
ANEXOS	35
ANEXO 1- A- <i>Brasiliorchis marginata</i> ; B- <i>Brasiliorchis picta</i> ; C- <i>Brasiliorchis schunkeana</i> ; D- <i>Brasiliorchis ubatubana</i> ; E- <i>Christensonella subulata</i> ; F- <i>Christensonella paranaensis</i> ; G- <i>Maxillariella robusta</i> ; H- <i>Mormolyca rufescens</i>	35
ANEXO 2- FORMAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS NAS FLORES POLINIZADAS DE <i>Christensonella</i> sp. E <i>Mormolyca rufescens</i>	36
ANEXO 3- FORMAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS NAS FLORES POLINIZADAS DE <i>Brasiliorchis picta</i> , <i>Brasiliorchis marginata</i> E <i>Brasiliorchis ubatubana</i>	37
ANEXO 4- TESTE DE VIABILIDADE DAS SEMENTES DE <i>Mormolyca rufescens</i> , <i>Brasiliorchis schunkeana</i> , <i>Brasiliorchis picta</i> e <i>Maxillariella robusta</i> SEM ARMAZENAMENTO.....	38
ANEXO 5- TESTE DE VIABILIDADE DAS SEMENTES DE <i>Mormolyca rufescens</i> , <i>Brasiliorchis schunkeana</i> , <i>Brasiliorchis picta</i> E <i>Maxillariella robusta</i> ARMAZENADAS A -20°C E -80°C POR 1 MÊS.....	39
CAPÍTULO II - GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i> (Hook.) R.B.Singer et al. e <i>Brasiliorchis schunkeana</i> (Campacci & kautsky) R.B. Singer et al. E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Brasiliorchis picta</i> (Orchidaceae)	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	43

2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO.....	45
2.2 POLINIZAÇÃO, COLETA, ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES.....	45
2.3 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
2.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS DE <i>Brasiliorchis picta</i>	47
3 RESULTADOS	47
3.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i>	47
3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>Brasiliorchis schunkeana</i>	50
3.3 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDA DE <i>Brasiliorchis picta</i>	53
4 DISCUSSÃO	54
5 CONCLUSÃO	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	60
ANEXO 1- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i> ARMAZENADAS A -20°C.....	
ANEXO 2- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Brasiliorchis picta</i> ARMAZENADAS A -80°C.....	
ANEXO 3- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Brasiliorchis schunkeana</i> ARMAZENADAS A -20°C.....	
ANEXO 4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Brasiliorchis schunkeana</i> ARMAZENADAS A -80°C.....	
ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O TRANSPLANTIO DE <i>Brasiliorchis picta</i> APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 6- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO EM mg L ⁻¹	
ANEXO 7- COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MACRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO.....	
ANEXO 8 -COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO.....	
CAPÍTULO III - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Brasiliorchis picta</i> (Hook.) R.B.Singer et al. E <i>Mormolyca rufescens</i> (Lindl.) M.A.Blanco (Orchidaceae) UTILIZANDO A TÉCNICA “THIN CELL LAYER” (TCL)..	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO.....	68
2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Brasiliorchis picta</i> E <i>Mormolyca rufescens</i>	68
2.2.1 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLBS A PARTIR DE FOLHAS INTEIRAS.....	68
2.2.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES UTILIZANDO A TÉCNICA DA TCL.....	69
2.2.3 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	71

3 RESULTADOS	70
3.1 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Brasiliorchis picta</i>	70
3.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Brasiliorchis picta</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DA TCL.....	71
3.3 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Mormolyca rufescens</i>	75
3.4 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Mormolyca rufescens</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DA TCL.....	76
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÃO	81
REFERENCIAS	81
ANEXOS	84
ANEXO 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES EM FOLHAS INTEIRAS DE <i>Brasiliorchis picta</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE <i>Brasiliorchis picta</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NUMERO MÉDIO DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE <i>Brasiliorchis picta</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES EM FOLHAS INTEIRAS DE <i>Mormolyca rufescens</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE <i>Mormolyca rufescens</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS.....	
ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NUMERO MÉDIO DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE <i>Mormolyca rufescens</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS.....	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas e especializadas do Reino Vegetal, com cerca de 20.000 espécies distribuídas em aproximadamente 850 gêneros (Atwood, 1986; Dressler, 1993). A distribuição destas plantas é cosmopolita, porém os principais centros de diversidade são as regiões tropicais da América e Ásia. No Brasil, foram identificadas 2433 espécies sendo que atualmente existem pelo menos 1424 espécies distribuídas em 179 gêneros na Mata Atlântica (Barros *et al.*, 2012).

Esta família, por apresentar flores ornamentais e de corte, corre risco de extinção, devido às coletas predatórias por seu grande potencial econômico (Colombo *et al.*, 2004). Soma-se a esse fato a crescente degradação da Mata Atlântica, reduzindo espécies e ocasionando o desaparecimento de seus polinizadores, dificultando ainda mais sua propagação.

Os gêneros *Brasiliorchis* R.B.Singer *et al.*, *Christensonella* Szlach. *et al.*, *Maxillariella* M.A.Blanco & Carnevali e *Mormolyca* Fenzl pertenciam anteriormente ao gênero *Maxillaria* Ruiz & Pav. Atualmente este grupo foi revisado e subdividido em outros gêneros seguindo resultados de estudos morfológicos e moleculares (Whitten 2007; Singer, Koehler e Carnevalil, 2007).

As orquídeas nativas apresentam duas formas de propagação, a vegetativa que se dá pela separação de touceiras ou pequenas mudas formadas a partir do rizoma e a sexuada, pela disseminação de sementes, onde cada cápsula pode conter até 500 mil sementes (Watanabe, 2002). Somente 5% destas sementes germinam por várias causas como: o ciclo de vida altamente especializado, com longo período vegetativo até o período reprodutivo, sementes com pouca ou nenhuma reserva, a germinação de sementes dependente da associação micorrízica, e a ação do homem por meio da destruição de seu *habitat*, além da coleta indiscriminada de orquídeas na natureza (Ferreira e Suzuki, 2008).

Estudos que tem como objetivo melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são importantes, não apenas para o conhecimento de seu cultivo, mas para preservá-las e com isso evitar sua extinção. Os bancos de sementes podem fornecer um meio de preservar a

máxima diversidade genética em um espaço e custo mínimo e as sementes de orquídeas têm características adequadas para isso (Seaton *et al.*, 2010).

A germinação assimbiótica de sementes *in vitro* vem sendo utilizada desde 1922, quando Lewis Knudson, obteve sucesso ao germinar sementes de orquídeas (Faria e Stancato, 1998). Após a germinação é desenvolvida uma estrutura chamada protocormo, que é semelhante ao hipocótilo das angiospermas (Pridgeon, 1999). Os explantes formam estruturas similares aos protocormos *in vitro* e estas estruturas são conhecidas como “protocorm-like bodies” (PLBs) (Arditti e Ernst, 1993).

Técnicas de micropropagação utilizando vários tipos de explantes foram testadas com sucesso (Ramos e Carneiro, 2007). No Brasil, a propagação *in vitro* vem sendo utilizada para aumentar a produção de mudas e contribuir para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção, auxiliando na recomposição da flora endêmica (Stancato *et al.*, 2001; Martini *et al.*, 2001). A tecnologia “thin cell layer” tem sido bem sucedida na multiplicação massal de orquídeas, tanto para propostas comerciais, como também de conservação (Teixeira da Silva e Dobránszki, 2013).

Considerando-se as atuais tecnologias e necessidades, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o sistema reprodutivo para estabelecer estratégias de conservação *ex situ* e *in vitro* para os gêneros *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Maxillariella* e *Mormolyca* (Orchidaceae). Para tanto, alguns objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) Testar diferentes tratamentos de polinização (autopolinização e polinização cruzada) para observação de crescimento de tubos polínicos;
- b) Testar a viabilidade das sementes sem armazenamento e armazenadas a -20°C e -80°C no banco de sementes, por meio de testes de viabilidade (tetrazólio) e de germinação após 1, 3, 6 e 12 meses;
- c) Testar o meio de cultura mais eficiente para a germinação *in vitro* destas espécies;
- d) Determinar a melhor concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) e tidiazuron (TDZ) para induzir a formação de estruturas semelhantes à protocormos (PLBs) a partir de folhas e protocormos cultivados *in vitro* destas espécies;

e) Determinar o melhor substrato de transplante e metodologia de aclimatização de mudas.

REFERENCIAS

ARDITTI J.; ERNST R. *Micropropagation of orchids*. New York: J. Wiley, 1993.

ATWOOD, J. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*. v.9, p. 171-186, 1986.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F F.V.A.; FRAGA, C.N. Orchidaceae *in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

COLOMBO L. A.; FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M. FONSECA, I.C.B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum*, Maringá, V.6, n.2, p. 253-258, 2004.

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

FARIA, R. T.; STRANCATO, G. C. Orquídea-semeadura. TOMBOLATO, A. F. C; COSTA, A. M. M. (coord.) *Micropropagação de plantas ornamentais*. (Boletim Técnico). IAC, Campinas. p. 37-39, 1998.

FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, I.G.; LINCHSTON, J.E.(orgs.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Natal: Imagem Gráfica, p. 67-68, 2008.

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

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*. 1st Edition. New York: Oxford University Press, 1999.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação "In Vitro" de *Cattleya x mesquिताe* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 37, n.1, p.10-15, 2007.

SEATON, P. T.; Hu, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. Ex situ conservation of orchids in a warming world. *The Botanical Review*, v.76, n.2, p. 193-203, 2010.

SINGER, R. B.; KOEHLER, S.; CARNEVALI, G. *Brasiliorchis*: A New Genus for the *Maxillaria picta* Alliance (Orchidaceae, Maxillarinae). *Novon*, v.17, n.1, p.91-99, 2007.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v.17, n.1, p.25-33, 2001.

TEXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *Journal of Plant Growth Regulation*, p. 1-22, 2013.

WATANABE, D. Orquídeas: manual de cultivo. 2. ed. São Paulo: AOSP, 2002. p. 296.

WHITTEN, W. M.; BLANCO, M. A.; WILLIAMS, N. H.; KOEHLER, S.; CARNEVALI, G.; SINGER, R. B.; ENDARA, L.; NEUBIG, K. M. Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) Based on combined molecular data sets. *American Journal of Botany*, v. 94, n.11, p.1860-1889, 2007.

CAPÍTULO I

Evolução do sistema reprodutivo e conservação de sementes de espécies de *Brasiliorchis* R.B.Singer *et al.*, *Christensonella* Szlach. *et al.*, *Maxillariella* M.A.Blanco & Carnevali e *Mormolyca* Fenzl (Orchidaceae)

RESUMO

Orchidaceae é uma das famílias mais representativas dentre as Angiospermas, porém vários fatores influenciam a reprodução de suas espécies. A crescente degradação da Mata Atlântica vem ocasionando redução do número de espécies e o desaparecimento de seus polinizadores, dificultando com isso, ainda mais a sua propagação. O presente trabalho tem como objetivo verificar a presença ou não de auto-incompatibilidade por meio da formação dos tubos polínicos de *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Mormolyca* e *Maxillariella* para compreender a sua forma de reprodução e estimar a viabilidade das sementes após armazenamento para conservação em bancos de sementes. Foram realizadas autopolinizações e polinizações cruzadas para a observação da formação de tubos polínicos a partir de 48 horas e analisados em microscópio de epifluorescência. As cápsulas foram coletadas, dessecadas e armazenadas em freezer a -20°C e -80°C , por 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Para avaliar a viabilidade das sementes foi realizado o teste do tetrazólio com sementes recém-colhidas e armazenadas. Observou-se que em 100% das polinizações cruzadas houve a formação dos tubos polínicos a partir de 96 horas. Para as flores autopolinizadas ocorreu a queda da flor após poucos dias ou a formação de tubos polínicos irregulares e com formação de calose. Os frutos formados resultantes de polinização cruzada produziram cápsulas com alta porcentagem de viabilidade de sementes, sendo superior à das armazenadas. A temperatura de -20°C pode ser indicada para o armazenamento de sementes de *M. robusta* e *B. schunkeana* e de -80°C para *B. picta* e *M. rufescens*. O armazenamento das sementes por diferentes períodos ocasionou a perda gradativa de viabilidade. No entanto, essas temperaturas podem ser recomendadas para o armazenamento em bancos de sementes, visto que houve uma taxa satisfatória de viabilidade (aproximadamente 40%), mesmo após nove e doze meses de armazenamento.

Palavras-chave: polinização, bancos de sementes, armazenamento, teste do tetrazólio

ABSTRACT

Orchidaceae is one of the most representative families among the Angiosperms, and many factors influence the reproduction of its species. The growing degradation of the Atlantic Forest has been causing the reduction of the species and the disappearing of its pollinators, making its propagation even harder. The present work has the objective to verify the presence or not of self-incompatibility by means of the formation of pollinic tubes of *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Mormolyca* and *Maxillariella* to understand its form of reproduction and estimate the viability of seeds after the storing to the conservation in seeds banks. There were realized self-pollination and crossed-pollination to verify the formation of pollinic tubes after 48 hours and analyzed in epifluorescence microscope. The capsules were collected, desiccated and stored in freezer at -20°C and -80°C , for 1,3,6,9 and 12 months. To evaluate the viability of the seeds, the tetrazolium test was done with freshly harvested and stored seeds. It was observed that in 100% of the crossed-pollination there was the formation of pollinic tubes after 96 hours. For the self-pollinated flowers it happened the fallen of the flower after few days or the formation of irregular pollinic tubes and with callous formation. The formatted fruit resulted from the crossed-pollination produced capsules with high percentage of viability of seeds, being higher than the ones that were stored. The temperature of -20°C can be indicated to storage of the seeds of *M. robusta* and *B. schunkeana* and of -80°C for *B. picta* and *M. rufescens*. The storage of seeds for different periods resulted in gradual loss of viability. However, these temperatures can be recommended for the storage in seeds banks, since there was a satisfactory rate of viability (around 40%), even after 9 and 12 months of storing.

Key-words: pollination, seeds banks, storage, tetrazolium test

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae A. Juss. é uma das mais representativas no que se refere as Angiospermas, atualmente acredita-se que haja de 17.000 a 35.000 espécies, com alta diversidade morfológica e ampla distribuição geográfica (Dressler, 1993). Porém, grande parte destas se encontram em regiões tropicais (Suttleworth *et al.*, 1997). No Brasil, mas especificamente na Mata Atlântica, foram identificadas pelo menos 1424 espécies distribuídas em 179 gêneros (Barros *et al.*, 2012).

Brasiliorchis marginata (Lindl.) R. B. Singer *et al.*, *Brasiliorchis picta* (Hook.) R. B. Singer *et al.*, *Brasiliorchis schunkeana* (Campacci e Kautsky) R. B. Singer *et al.*, *Brasiliorchis ubatubana* (Hoehne) R. B. Singer *et al.*, *Maxillariella robusta* (Barb.Rodr.) M. A. Blanco & Carnevali, *Mormolyca rufescens* (Lindl.) M. A. Blanco, *Christensonella paranaensis* (Barb. Rodr.) S. Koehler e *Christensonella subulata* (Lindl.) Szlach. *et al.* são espécies de orquídeas herbáceas, nativas, de hábito epifítico que ocorrem na Mata Atlântica, porém nem todas são endêmicas do Brasil (Barros *et al.*, 2012).

As orquídeas nativas apresentam duas formas de propagação, a vegetativa que se dá pela separação de touceiras ou pequenas mudas formadas a partir do rizoma e a sexuada, pela disseminação de sementes, onde cada cápsula pode conter até 500 mil sementes (Watanabe, 2002). Somente 5% destas sementes germinam por várias causas como: o ciclo de vida altamente especializado, com longo período vegetativo até o período reprodutivo, sementes com pouca ou nenhuma reserva, a germinação de sementes dependente da associação micorrízica e a ação do homem por meio da destruição de seu *habitat*, além da coleta indiscriminada de orquídeas na natureza (Ferreira e Suzuki, 2008).

Vários fatores influenciam a reprodução destas orquídeas, como a disposição do pólen, reunido em polínias que quando removidas de forma ineficiente por seus polinizadores pode resultar em grande perda de pólen, influenciando negativamente o sucesso reprodutivo destas espécies (Tremblay, 1992). Porém também há a retirada da planta na natureza para o comércio,

pois estas apresentam flores de grande beleza ornamental e importância econômica, acarretando em risco de extinção, devido às coletas predatórias por seu grande potencial econômico (Colombo *et al.*, 2004). Além disso, há ocorrência da crescente degradação da Mata Atlântica que vem ocasionando redução de espécies, ocorrendo o desaparecimento de seus polinizadores e dificultando com isso, ainda mais a sua propagação.

O sistema reprodutivo utilizado por uma população é um importante fator na determinação de sua variabilidade genética. Embora a maioria das espécies de orquídeas sejam auto-compatíveis, a auto-polinização em geral é evitada por barreiras que ajudam a garantir a manutenção dos níveis de variabilidade genética de moderados a elevados dentro das populações (Borba e Semir, 1999; Dressler, 1993; Van der Pijl e Dodson, 1996).

As orquídeas podem apresentar auto-incompatibilidade do tipo gametofítico, que ocorre ao nível do estilete, onde, por mecanismos químicos ocorre formação de calose na altura da coluna, impedindo assim o crescimento do tubo polínico (Bruckner *et al.*, 2005). Barreiras genéticas e mecânicas como estas, podem explicar parte da evolução destas plantas (Borba e Braga, 2003).

Para conservação *ex situ* de orquídeas são necessários testes de viabilidade de sementes como o teste de germinação e o do tetrazólio. O teste de tetrazólio apresenta como principal vantagem a rapidez com que fornece resultados, além de não ser afetado pela presença de fungos e bactérias que constantemente mascaram os resultados dos testes de germinação (Pina-Rodriguez *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivos verificar a presença de auto-incompatibilidade sexual por meio da observação da formação de tubos polínicos de *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Mormolyca* e *Maxillariella* spp. e com isso compreender a sua forma de reprodução; estimar a viabilidade das sementes após armazenamento sob vários períodos e diferentes condições em bancos de sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO

O trabalho foi realizado com *Brasiliorchis marginata*, *Brasiliorchis picta*, *Brasiliorchis schunkeana*, *Brasiliorchis ubatubana*, *Christensonella paranaensis*, *Christensonella subulata*, *Maxillariella robusta* e *Mormolyca rufescens* (ANEXO 1), provenientes da Mata Atlântica e cultivadas na casa de vegetação da Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e no Orquidário Frederico Carlos Hoehne do Instituto de Botânica de São Paulo (IBOT-SP).

2.2 POLINIZAÇÃO

Foram utilizadas flores de espécies dos gêneros *Brasiliorchis*, *Christensonella*, *Maxillariella* e *Mormolyca* que estavam em antese, as quais foram polinizadas manualmente, removendo a polínia e inserindo-a no estigma. Foram realizadas polinizações cruzadas e autopolinizações, de acordo com a disponibilidade de flores. Para a polinização cruzada foram utilizados indivíduos de coletas de populações distintas (TABELA 1).

2.3 ANÁLISE DE TUBOS POLÍNICOS

Para análise dos tubos polínicos foram coletadas flores provenientes de autopolinização e polinização cruzada. A quantidade de flores variou conforme a disponibilidade, sendo no mínimo duas flores por tratamento (TABELA 1). Foi analisado o crescimento dos tubos polínicos das flores fecundadas e abortadas. As flores foram fixadas em FAA 70% e etanol 70%,

para observação do alongamento do tubo polínico e depósito de calose. Posteriormente, as flores foram tratadas com NaOH 9N a 50°C por aproximadamente 40 minutos, lavadas em água destilada, as amostras foram colocadas em lâminas, coradas com azul de anilina e esmagadas com lamínula para a observação em microscópio de epifluorescência Zeiss® 370 do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFPR. O preparo das lâminas para interpretação dos tubos polínicos foi realizado segundo o método de Borba *et al.* (2001).

Para *Brasiliorchis schunkeana* e *Maxillariella robusta* estas análises não foram realizadas, sendo somente a polinização para obtenção de sementes para observação de viabilidade de sementes e germinação *in vitro*.

TABELA 1 – POLINIZAÇÕES CONTROLADAS DE ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS ORIGINADAS DE AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA, FIXADAS EM FAA 70% PARA OBSERVAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS.

Espécies	Flores por tipo de polinização
<i>Brasiliorchis picta</i>	
UFPR	8 (4A/4C)
1407d	4 (2A/2C)
1378	4 (2A/2C)
1308	8 (4A/4C)
<i>B. marginata</i>	
1877d	4 (2A/2C)
1848	4 (2A/2C)
6171	4 (2A/2C)
1308	4 (2A/2C)
<i>B. ubatubana</i>	
6054	6(3A/3C)
17553	6(3A/3C)
6254	4(2A/2C)
6053	4(2A/2C)
1109	8(4A/4C)
5597	10(5A/5C)
<i>Christensonella paranaensis</i>	
13822	24 (12A/12C)
1003	10 (5A/5C)
1139	8 (4A/4C)
12151	10 (5A/5C)
6004	18 (9A/9C)
6005	18 (9A/9C)
1459	10 (5A/5C)
a324	24 (12A/12C)
<i>Christensonella subulata</i>	
11765	8 (4A/4C)
12000	8 (4A/4C)
<i>Mormolyca rufescens</i>	
958	10 (5A/5C)
a329	10 (5A/5C)
11377	8 (4A/4C)
49515	8 (4A/4C)
15741	12 (6A/6C)
8469	12 (6A/6C)
4692D	6 (3A/3C)
4695	6 (3A/3C)

* A para autopolinização e C para polinização cruzada. Para polinizações cruzadas foram utilizadas flores de populações distintas.

As seguintes variáveis foram avaliadas: tubo polínico compatível (determinado por um crescimento linear), tubo polínico auto-incompatível ao nível do estilete (determinado por um crescimento em zigue-zague com formação de calose na altura da coluna).

2.4 COLETA, ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES

As cápsulas de *B. picta*, *B. schunkeana*, *Maxillariella robusta* e *Mormolyca rufescens* foram coletadas, armazenadas em frascos e levadas ao Laboratório de Micropropagação Vegetal da UFPR. O protocolo de secagem e armazenamento de sementes seguiu as indicações do projeto “Orchid Seed Storage for Sustainable Use” (OSSSU) conforme recomendação de Seaton e Ramsay (2005).

As cápsulas ainda imaturas, iniciando a transformação da cor do fruto de verde para amarelada ou marrom foram coletadas e levadas ao laboratório. A limpeza das cápsulas foi realizada com água corrente e sabão neutro, seguida de imersão em etanol 70% durante cinco minutos. Em seguida, os frutos foram cortados no sentido longitudinal, as sementes raspadas sobre papel filtro e inseridas em placa de Petri. Estas foram armazenadas em dessecador de vidro, contendo solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl_2), e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente sete dias. Posteriormente as sementes foram transferidas para pequenos frascos de vidro, etiquetados e armazenados em frascos de vidro maiores, juntamente com sílica laranja. Após este processo, as sementes foram armazenadas em freezer a -20°C e a -80°C , por um período de um, três e seis meses.

Para a estimativa de viabilidade dos embriões, foram realizadas contagens de aproximadamente 2000 sementes por fruto segundo a metodologia proposta por Borba *et al.* (2001). Para esta análise, três resultados foram observados: embriões viáveis, embriões inviáveis e ausência de embriões. Estes resultados foram comparados entre plantas auto-polinizadas e com polinização cruzada.

Após o armazenamento, a viabilidade das sementes foi avaliada pelo teste bioquímico de tetrazólio (cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio) com a utilização de 1 mg de sementes, pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% por 24 horas. Em seguida, as sementes foram transferidas para a solução de tetrazólio 1%, mantidas por 24 horas em banho-maria à temperatura constante de 40°C . Após este tratamento, o material foi colocado em placa de Petri (100

mm de diâmetro x 20 mm de comprimento) para avaliação em microscópio estereoscópico e fotografado para contagem de sementes viáveis. As sementes foram classificadas em três grupos: viáveis (coloração vermelha), inviáveis (coloração branca) e palha (sem embrião), segundo metodologia estabelecida por Hosomi (2009).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DE TUBOS POLÍNICOS

No presente trabalho, observou-se a formação de tubos polínicos após 48 horas da polinização para as espécies *Cristensonella subulata* e *Mormolyca rufescens*. Para as demais espécies, a formação dos tubos polínicos ocorreu 72 ou 96 horas após a polinização (TABELA 2) (ANEXO 2).

Em relação à polinização das flores foi observado para a maioria das espécies que houve formação de tubos polínicos com calose quando estas foram autopolinizadas e não ocorreu a formação de calose quando estas sofreram polinizações cruzadas (TABELA 2).

Das flores de *B. ubatubana* e *B. marginata*, autopolinizadas 72 ou 96 horas após a polinização não ocorreu formação de tubos polínicos. As flores de *B. ubatubana* submetidas à polinização cruzada após 72 horas não desenvolveram tubos polínicos (TABELA 2) (ANEXO 3).

TABELA 2- DESENVOLVIMENTO DE TUBOS POLÍNICOS EM *Brasiliorchis picta*, *Brasiliorchis marginata*, *Brasiliorchis ubatubana*, *Christensonella paranaensis*, *Christensonella subulata* E *Mormolyca rufescens* EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO CRUZADA.

Espécie	Tipo de polinização	Tempo decorrido da polinização	Formação de tubos polínicos	Formação de tubos polínicos com calose	Não formação de tubos polínicos
<i>Brasiliorchis picta</i>	A	408 horas		X	
	A	2 meses		X	
	C	72 horas	X		
	C	408 horas	X		
	C	2 meses	X		
<i>Brasiliorchis marginata</i>	A	96 horas			X
	A	3 meses		X	
	C	96 horas	X		
<i>Brasiliorchis ubatubana</i>	C	3 meses	X		
	A	72 horas			X
	A	96 horas		X	
	A	168 horas		X	
	C	72 horas			X
	C	96 horas	X		
<i>Christensonella paranaensis</i>	C	144 horas	X		
	C	168 horas	X		
	A	96 horas		X	
	C	48 horas		X	
	C	72 horas		X	
	C	72 horas	X		
<i>Christensonella subulata</i>	C	96 horas		X	
	C	192 horas	X		
	A	72 horas		X	
	A	48 horas	X		
	C	48 horas	X		
<i>Mormolyca rufescens</i>	C	72 horas		X	
	C	72 horas	X		
	C	192 horas	X		
	A	192 horas		X	
	A	72 horas		X	
	A	72 horas		X	
	C	48 horas	X		
	C	72 horas	X		
C	168 horas	X			
C	192 horas		X		
C	264 horas		X		

3.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES PELO TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ)

Para todas as espécies estudadas, a maior porcentagem de sementes viáveis foi observada nas sementes que não foram armazenadas, com o melhor resultado para *M. rufescens* e o pior para *M. robusta* (FIGURA 1). No entanto, a viabilidade das sementes de *M. robusta* após o armazenamento apresentou resultados semelhantes nas temperaturas e tempos de armazenamento.

Observou-se uma redução significativa da viabilidade das sementes para a espécie *M. rufescens*, não sendo recomendado seu armazenamento nas temperaturas e tempos testados (FIGURA 1) (ANEXO 4 E 5).

As sementes da espécie *Brasiliorchis schunkeana* foram analisadas aos nove meses, pois o amadurecimento e a abertura de suas cápsulas ocorreram tardiamente em relação às demais espécies. Foram obtidos os seguintes resultados: para armazenamento a -20°C ocorreu 47,15% de viabilidade e para armazenamento a -80°C uma redução para 25,12% de viabilidade (ANEXO 4 E 5).

O armazenamento das sementes em diferentes períodos e em diferentes temperaturas ocasionou a perda de viabilidade. Porém, de maneira geral observou-se que o armazenamento a -20°C foi mais eficiente para *M. robusta* e *B. schunkeana*, enquanto que para *B. picta* recomenda-se a temperatura de -80°C (FIGURA 1) (ANEXO 5).

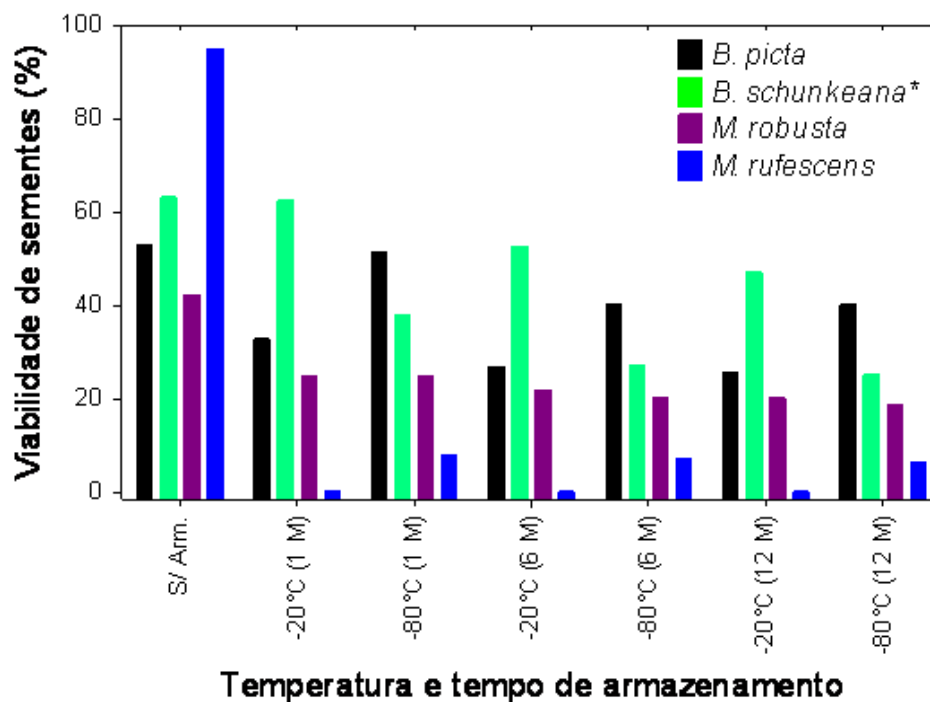


FIGURA 1. VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis picta*, *Brasiliorchis schunkeana*, *Mormolyca rufescens* E *Maxillariella robusta* AVALIADAS PELO TESTE DO TETRAZÓLIO.

* Para a espécie *Brasiliorchis schunkeana*, foi realizada a última análise após nove meses.

4 DISCUSSÃO

Com este trabalho foi observado que gêneros próximos, antes pertencentes ao mesmo gênero (*Maxillaria*), podem apresentar diferenças quanto ao seu tipo de polinização.

Observou-se que na grande maioria das polinizações cruzadas houve a formação de tubos polínicos e para as flores autopolinizadas ocorreu a queda da flor após poucos dias ou a formação de tubos polínicos irregulares e com formação de calose. Dressler (1981) e Van der Pijl e Dodson (1996) observaram que em Orchidaceae, a maioria das espécies é auto-compatível, no entanto, a polinização cruzada parece ser regra, como também foi observado no presente trabalho. Segundo Catling e Catling (1991) a prevenção da autopolinização é favorecida principalmente pela presença de mecanismos florais, podendo em alguns casos estes serem ineficientes ou inexistentes,

então barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos pode evitar a formação de frutos resultantes de flores autopolinizadas (Johansen, 1990).

A auto-incompatibilidade também foi encontrada em espécies de *Acianthera* com sistemas específicos de polinização (Borba e Semir, 2001; Borba *et al.*, 2001). O crescimento reduzido dos tubos polínicos em tratamentos de autopolinização de *A. sonderana* e a má formação de tubos polínicos de flores abortadas sugerem uma inibição do crescimento dos tubos polínicos no estilete, o que é característico de auto-incompatibilidade homomórfica gametofítica (Richards, 1986). Johansen (1990) e Tremblay (1992) relataram que barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos letais, podem induzir aborto em flores autopolinizadas e isso poderia explicar os resultados encontrados para as espécies estudadas neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que flores com polinizações cruzadas formaram tubos polínicos e que flores autopolinizadas não obtiveram resultados semelhantes, com isso acredita-se que na natureza a polinização cruzada seria favorecida. Este mecanismo observado em laboratório também ocorre em ambientes naturais, onde a polinização das flores é realizada pelas abelhas. Porém nem sempre este mecanismo é eficiente, pois há necessidade de sucesso no transporte da polínia e é necessário que a mesma seja proveniente de plantas de populações distintas. Segundo Smidt *et al.* (2006), as abelhas encontradas dentro de flores de *Cattleya elongata* e *Bulbophyllum brevivillus* visitam as flores sem remover o polinário. Em geral, isso ocorre apenas nos primeiros dias de florada, sugerindo que são capazes de reconhecer que estas flores não apresentam recompensas após um curto período de interação com elas (Singer e Cocucci 1999, Singer e Koehler, 2004). Com isso pode-se inferir que os experimentos realizados em laboratório teriam um papel importante na reintrodução de espécies ameaçadas, visto que plantas polinizadas manualmente de forma cruzada teriam 100% de formação de frutos.

Para os frutos formados resultantes de polinização cruzada, observou-se uma alta taxa de viabilidade de sementes enquanto que as flores autopolinizadas foram abortadas. Isso não ocorreu para espécies como *Cattleya*, que formaram frutos com taxa semelhante de viabilidade de sementes

tanto em autopolinização quanto na polinização cruzada (Smidt *et al.*, 2006). Entretanto, para outras espécies, dentro do mesmo gênero, pode ocorrer uma diferença significativa quanto à viabilidade das sementes (Smidt *et al.*, 2006), sendo que em sua maioria quando formaram-se os frutos resultado de autopolinização, as sementes podem perder sua viabilidade. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados neste estudo da mesma maneira que, em *Epidendrum paniculatum*, 95% das polinizações cruzadas resultaram em frutos, sem registros de aborto e após autopolinização manual, somente um fruto foi formado (Pansarin, 2003).

Em relação à viabilidade das sementes armazenadas em diferentes períodos foi observado que a taxa de viabilidade das sementes que não foram armazenadas, foi maior do que a das armazenadas. Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) também constataram que ocorreu perda da viabilidade das sementes de 16 espécies de orquídeas, com o aumento do período de armazenamento. Isso pode ser resultado do envelhecimento e pelo endosperma reduzido que as sementes de orquídeas apresentam. Resultados semelhantes também foram obtidos por Stancato *et al.* (1998) que observaram a degradação e o envelhecimento das sementes de orquídeas devido ao conteúdo reduzido de reserva das mesmas.

Em relação às temperaturas testadas, a temperatura ideal para conservação num banco de sementes varia conforme a espécie de orquídea. A temperatura de -20°C pode ser indicada para o armazenamento de sementes de *B. schunkeana*. Essa temperatura também foi recomendada para a conservação de *B. forbesii* (Franceschi, 2013) e temperatura semelhante (-18°C) para *Cattleya intermedia* (Alvarez-Pardo e Ferreira, 2006). Entretanto, para outras espécies estudadas no presente trabalho (*B. picta* e *M. rufescens*) a temperatura de -80°C foi melhor. Franceschi (2013) também recomendou essa temperatura para *Grandiphyllum pulvinatum*, *Gomesa recurva* e *Brasilidium praetextum*. Essas temperaturas podem ser recomendadas para o armazenamento de sementes das espécies aqui abordadas, visto que houve uma taxa satisfatória de viabilidade das sementes (aproximadamente 40%), mesmo após nove e doze meses de armazenamento. Segundo Machado Neto

e Custódio (2005), sementes armazenadas em condições que não são ideais podem estar sujeitas a perda da viabilidade.

As avaliações de viabilidade das sementes armazenadas finalizaram aos nove e doze meses, sendo observada a viabilidade da técnica de germinação *in vitro* com essas sementes. Porém não se podem inferir estes resultados para períodos maiores de armazenamento ou para espécies diferentes, pois conforme literatura há uma grande variação de comportamento de sementes para diferentes espécies. Segundo Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) houve perda da viabilidade das sementes de 16 espécies de orquídeas com o avanço do período de armazenamento. Em espécies como *Maxillaria picta* e *Cattleya labiata*, perderam quase completamente a viabilidade em 30 meses.

5 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, conclui-se que para *Brasiliorchis picta*, *B. marginata*, *B. schunkeana*, *B. ubatubana*, *Christensonella paranaensis*, *C. subulata*, *Maxillariella robusta* e *Mormolyca rufescens*, que a polinização cruzada comporta-se como via de regra para a formação de tubos polínicos compatíveis e conseqüente formação de frutos com sementes viáveis para ambas as temperaturas de armazenamento.

Em relação à viabilidade das sementes, houve uma pequena redução gradativa na viabilidade com o passar do tempo de armazenamento, independente da temperatura. Porém, ainda se mantém uma taxa de aproximadamente 40% das sementes viáveis, após doze meses de armazenamento. Considerando que em apenas uma cápsula pode-se encontrar cerca de 1 milhão de sementes, logo os resultados aqui encontrados são significativos para a preservação das mesmas em bancos de sementes.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. *Revista Brasileira de Sementes* v. 28, n. 2, p.92-98, 2006.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F F.V.A.; FRAGA, C.N. Orchidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.
- BORBA E. L.; BRAGA P. I. S. Reproductive biology of *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melittophyly and self-compatibility in a basal Laeliinae. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 26, p.541-549, 2003.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J. Temporal variation in pollinarium size in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, v. 217, p.197-204, 1999.
- BORBA E. L. e SEMIR J. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*. v. 88, p. 75–88, 2001.
- BORBA, E. L.; SHEPHERD, G. J.; SEMIR, J. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany*, v. 88, p. 89-99, 2001.
- BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. de M. F.; RÊGO, M. M. do; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: *Embrapa Cerrados*, 2005. p. 319.
- CATLING, P. M.; CATLING, V. R. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. *Lindleyana*, v. 6, p. 113–116, 1991.
- COLOMBO L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M. FONSECA, I. C. B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 6, n. 2, p.253-258, 2004.

- DRESSLER, R. L. *The orchids. Natural history and classification*. England: Harvard Univ. Press, 1981.
- DRESSLER, R. L. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press, 1993.
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, I.G.; LINCHSTON, J.E.(orgs.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Natal: Imagem Gráfica, p.67-68, 2008.
- FRANCESCHI, C. R. B. *Conservação de sementes e micropropagação de orquídeas da Mata Atlântica utilizando a técnica "Thin Cell Layer"*. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- HOSOMI, S. T. *Germinação, viabilidade e armazenamento de sementes de Cattleya (Orchidaceae)*. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009.
- JOHANSEN, B. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. v. 103, p. 165-196, 1990.
- MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO C. C. Orchid Conservation through seed banking: ins and outs. *Selbyana*, v. 26, n. 1, p. 229-235, 2005.
- PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruíz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. v. 26, p. 203-211, 2003.
- PINA-RODRIGUES, F. C. M; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.283-297.
- RICHARDS, A. J. *Plant breeding systems*. London: George Allen e Unwin, 1986.
- SEATON, P. T.; RAMSAY, M. Growing orchids from seed. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

SINGER, R. B.; COCUCI, A. A. Notas comparativas sobre *Odontorrhynchus castillonii* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Kurtziana*, v. 27, n. 2, p. 387-390, 1999.

SINGER, R. B.; KOEHLER, S. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). *Annals of Botany*. v. 93, p. 39-51, 2004.

SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E. L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology*. v. 21, p. 85–89, 2006.

STANCATO G. C., CHAGAS E. P., MAZZAFERA P. Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana* v.13, p. 97–100, 1998.

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. *Orquídeas: Guia dos orquidófilos*. 5. ed. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro. 1997.

TREMBLAY, R. L. Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany*. v. 70, p. 642-650, 1992.

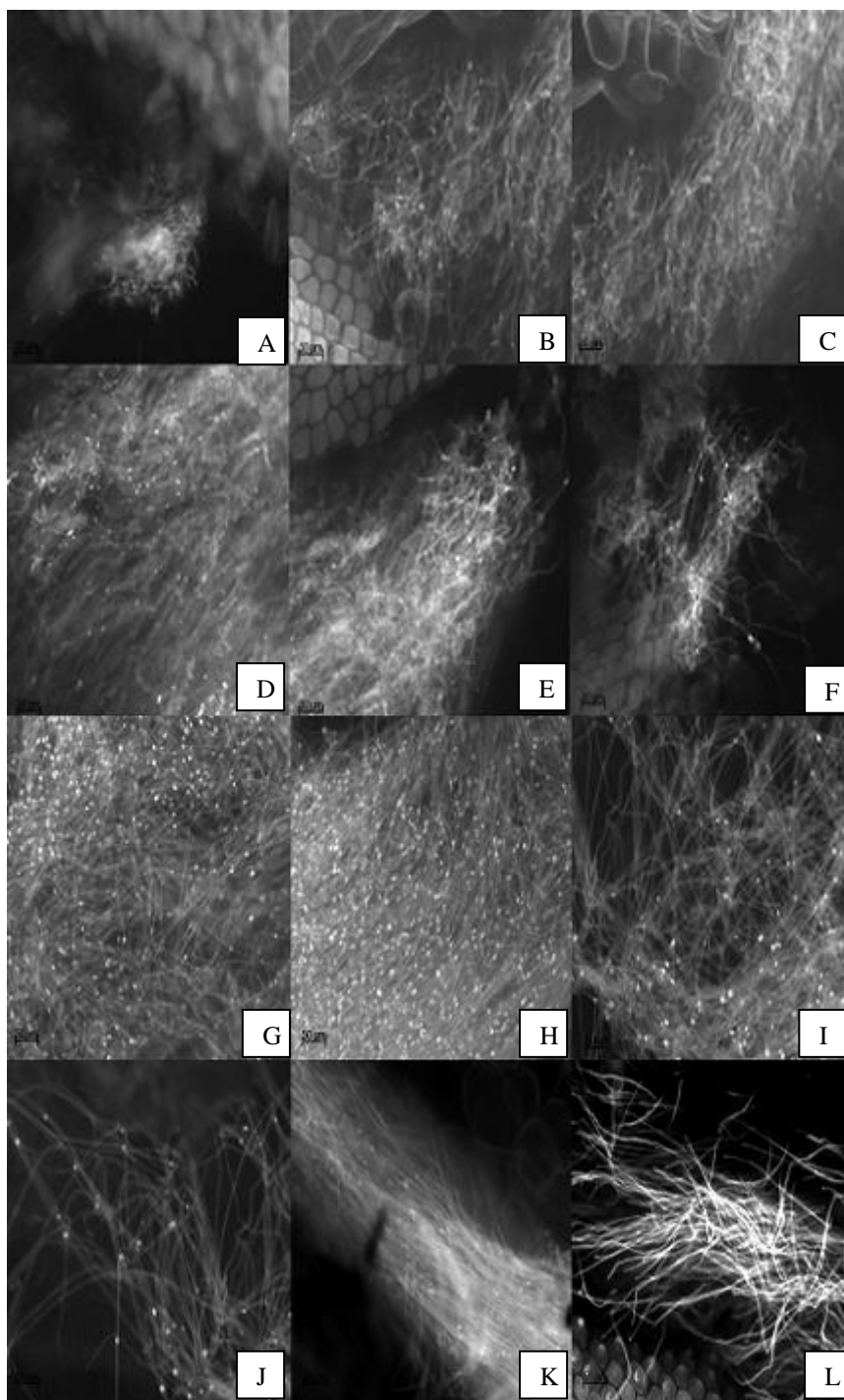
VAN DER PIJL, L.; DODSON, C. H. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami, 1996.

WATANABE, D. *Orquídeas: manual de cultivo*. 2. ed. São Paulo: AOSP, 2002.

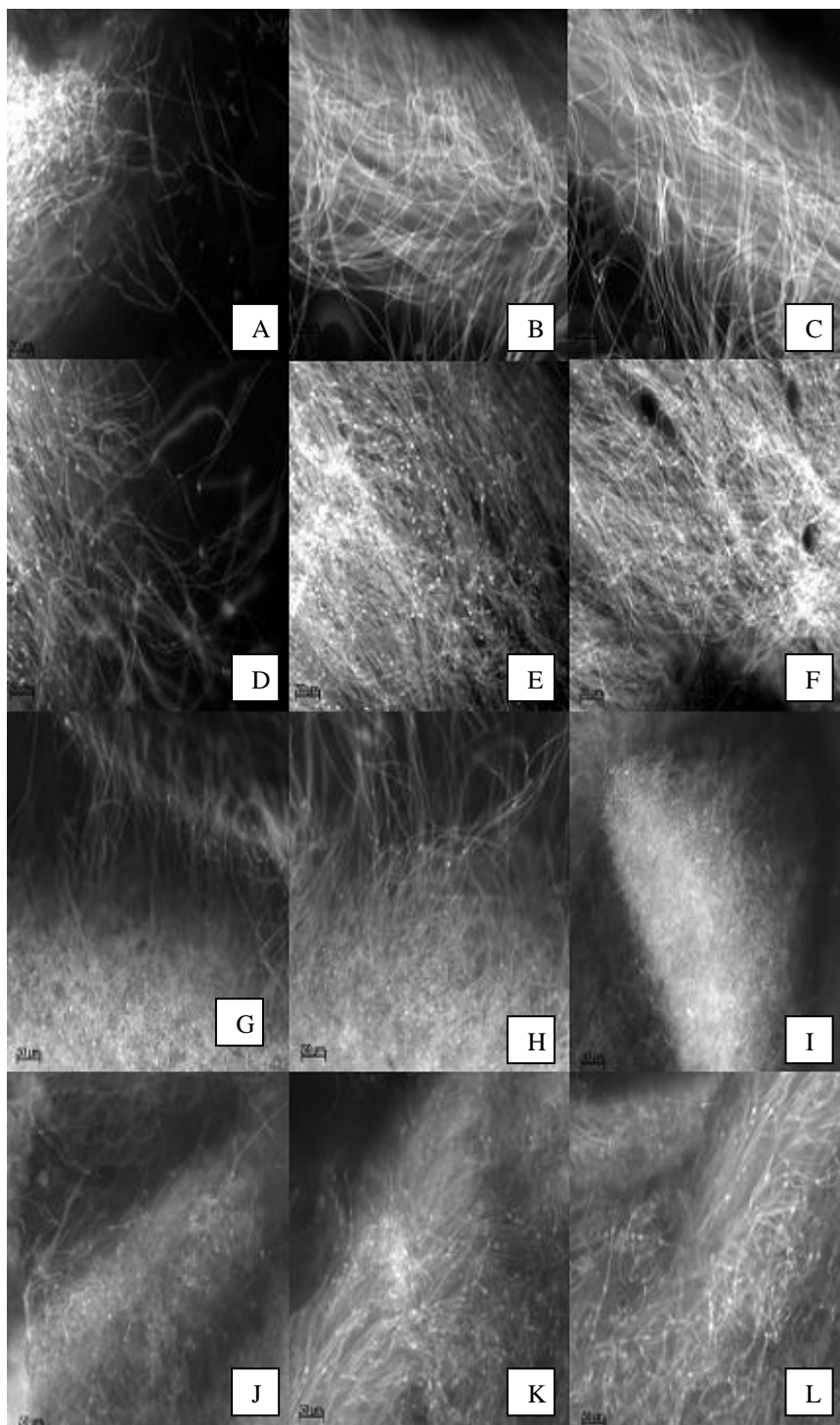
ANEXOS



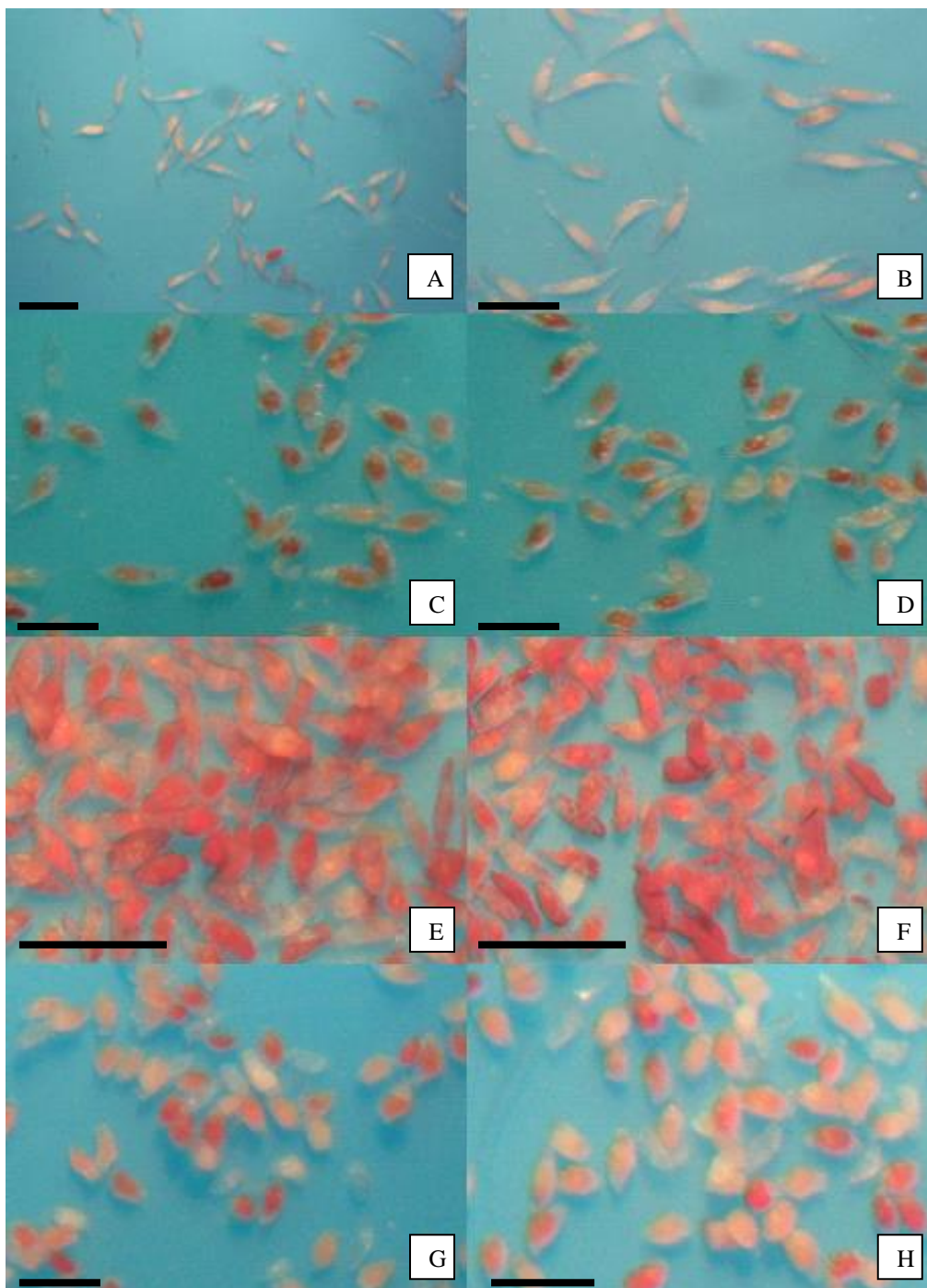
ANEXO 1- A- *Brasiliorchis marginata*; B- *Brasiliorchis picta*; C- *Brasiliorchis schunkeana*; D- *Brasiliorchis ubatubana*; E- *Christensonella subulata*; F-*Christensonella paranaensis*; G- *Maxillariella robusta*; H- *Mormolyca rufescens*.



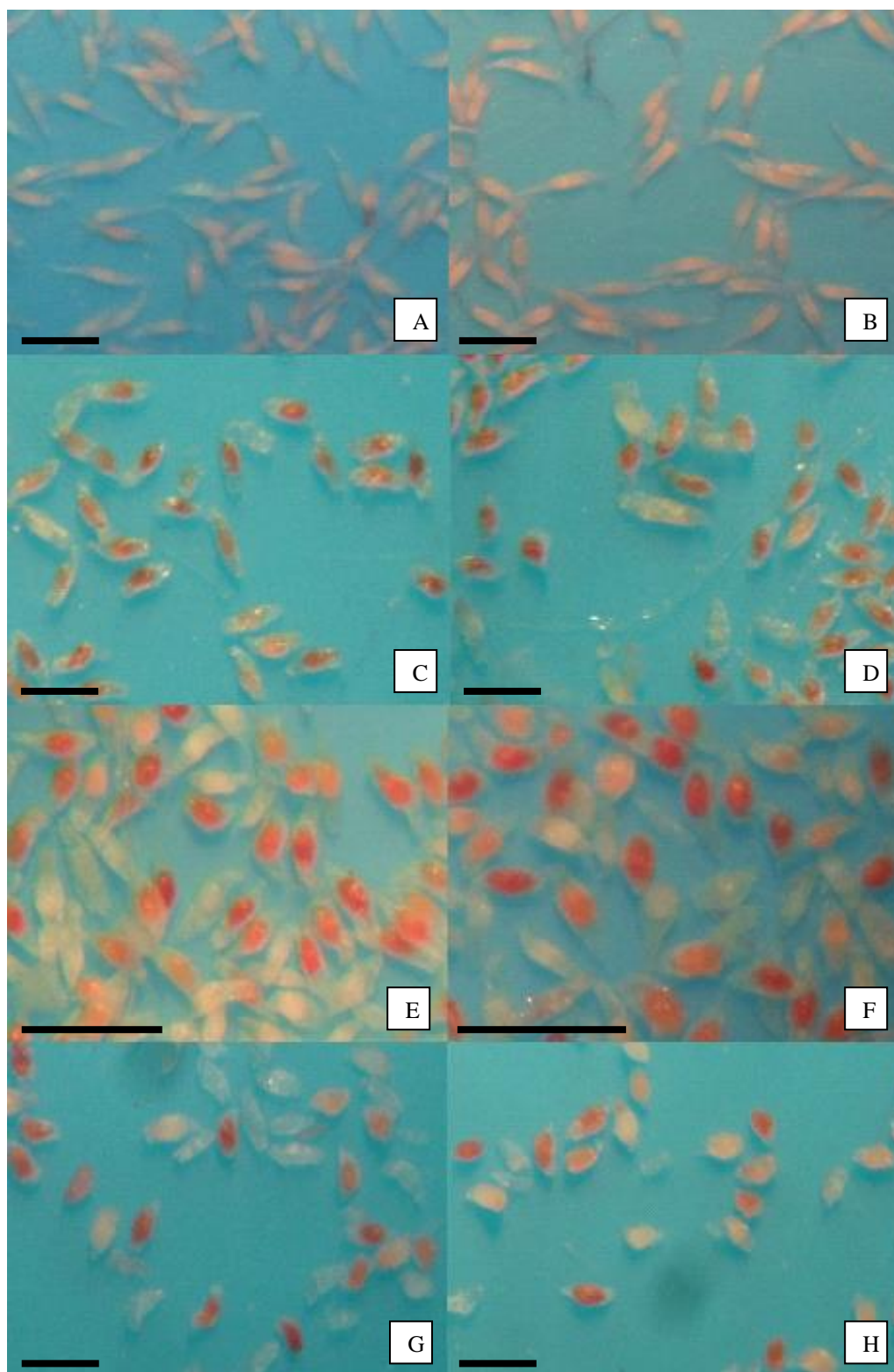
ANEXO 2- FORMAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS NAS FLORES POLINIZADAS DE *Christensonella* sp. E *Mormolyca rufescens*. A- *C. subulata* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); B- *C. subulata* - AUTOPOLINIZAÇÃO (48 HORAS); C- *C. subulata* - AUTOPOLINIZAÇÃO (48 HORAS); D- *Christensonella paranaensis* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); E- *C. paranaensis* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); F- *C. paranaensis* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); G- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); H- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); I- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); J- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (168 HORAS); K- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (168 HORAS); L- *M. rufescens* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (168 HORAS). BARRA= 50 μ m.



ANEXO 3- FORMAÇÃO DE TUBOS POLÍNICOS NAS FLORES POLINIZADAS DE *Brasiliorchis picta*, *Brasiliorchis marginata* E *Brasiliorchis ubatubana*. A- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); B- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); C- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); D- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); E- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); F- *B. picta* - POLINIZAÇÃO CRUZADA (72 HORAS); G- *B. marginata* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (3 MESES); H- *B. marginata* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (3 MESES); I- *B. marginata* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (3 MESES); J- *Brasiliorchis ubatubana* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); K- *B. ubatubana* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); L- *B. ubatubana* – POLINIZAÇÃO CRUZADA (192 HORAS); BARRA= 50 µm.



ANEXO 4- TESTE DE VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Mormolyca rufescens* (A e B), *Brasiliorchis schunkeana* (C e D), *Brasiliorchis picta* (E e F) e *Maxillariella robusta* (G e H) SEM ARMAZENAMENTO.



ANEXO 5- TESTE DE VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Mormolyca rufescens*, *Brasiliorchis schunkeana*, *Brasiliorchis picta* E *Maxillariella robusta* ARMAZENADAS A -20°C E -80°C POR 1 MÊS; B - ARMAZENADAS A -80°C POR 1 MÊS; *B. schunkeana*. C- ARMAZENADAS A -20°C POR 1 MÊS; D - ARMAZENADAS A -80°C POR 1 MÊS; *B. picta* E – ARMAZENADAS A -20°C POR 1 MÊS; F - ARMAZENADAS A -80°C POR 1 MÊS; *M. robusta* G- ARMAZENADAS A -20°C POR 1 MÊS; H - ARMAZENADAS A -80°C POR 1 MÊS;

CAPÍTULO II

Germinação *in vitro* de sementes de *Brasiliorchis picta* (Hook.) R.B.Singer *et al.* e *Brasiliorchis schunkeana* (Campacci & Kautsky) R.B. Singer *et al.* e aclimatização de *Brasiliorchis picta* (Orchidaceae)

RESUMO

Brasiliorchis picta e *Brasiliorchis schunkeana* são espécies epífitas, com potencial ornamental, que apresentam origem nativa e endêmica do Brasil. Estão ameaçadas de extinção pela exploração desordenada e dificuldade de propagação sexuada na natureza. Bancos de sementes e germinação *in vitro* possibilitam a conservação dessas espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor temperatura e período de armazenamento das sementes e estabelecer protocolo de germinação assimbiótica de *Brasiliorchis picta* e *Brasiliorchis schunkeana*. Sementes recém-colhidas e armazenadas a -20°C e -80°C por 1, 3, 6 e 12 meses foram germinadas nos meios KC, MS, MS/2 e WPM. Após 90 dias foi avaliada a porcentagem de germinação, considerando germinadas as sementes com embrião intumescido e clorofilado, característico do estágio de protocormo com rizóide e ápice. Plântulas de cinco meses obtidas da germinação *in vitro* de *B. picta* foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo os substratos Plantmax®, vermiculita e casca de coco em pó, isolados ou combinados. Para ambas as espécies, a porcentagem de germinação foi mais alta em sementes sem armazenamento, seguida das armazenadas a -20°C e os melhores meios de cultura foram MS e WPM. Para a aclimatização das mudas de *B. picta*, observou-se a maior porcentagem de sobrevivência (96,67%) quando a vermiculita foi utilizada como substrato. Recomenda-se que o armazenamento em bancos de sementes seja feito a -20°C, uma vez que as sementes de *B. picta* foram armazenadas até 12 meses e de *B. schunkeana* até seis meses, com pequena redução da viabilidade. A germinação *in vitro* deve ser realizada em meio WPM por ter proporcionado a maior porcentagem de germinação e vigor das plantas.

Palavras-chave: conservação, bancos de sementes, meio de cultura, germinação assimbiótica.

ABSTRACT

Brasiliorchis picta and *Brasiliorchis schunkeana* are epiphytic species, with ornamental potential, with native and endemic origin in Brazil. They are endangered due to the uncontrolled exploitation and difficulty of sexual propagation in nature. Banks of seeds and *in vitro* germination enable the conservation of these species. The aim of this study was to evaluate the best temperature and period of the storage of seeds and establish a protocol for asymbiotic germination of *Brasiliorchis picta* and *Brasiliorchis schunkeana*. Freshly harvested and seeds stored at -20°C and -80°C for 1, 3, 6 and 12 months were germinated in KC, MS, MS/2 and WPM media. After 90 days, the percentage of germination was evaluated considering germinated the seeds with one tumid embryo, normal feature of the protocorm with rhizoids and apex. Plantlets were transplanted in seeding trays, containing Plantmax® substrate, vermiculite and coconut shell powder, alone or combined. For both species, the percentage of germination was higher in non-stored seeds, followed by the stored ones in -20°C and the best media for culture were MS and WPM. For acclimation of the seedlings of *B. picta*, it was observed a greater percentage of surviving (96,67%) when the vermiculite was utilized as subtract. It is recommended that the storage in banks of seed is made in -20°C, once the seeds of *B. picta* were stored till 12 months and of *B. schunkeana* till 6 months, with little reduction of viability. The *in vitro* germination must be realized in WPM ambient, because it has offered the largest percentage of germination and vigor of the plants.

Key-words: conservation, bank of seeds, ambient of culture, asymbiotic germination.

1 INTRODUÇÃO

Brasiliorchis picta (Hook.) R. B. Singer *et al.* e *Brasiliorchis schunkeana* (Campacci e Kautsky) R. B. Singer *et al.* são espécies herbáceas e epífitas, que apresentam origem nativa e endêmica do Brasil. Seus domínios fitogeográficos englobam o bioma Mata Atlântica. *B. picta* ocorre nos Estados da região Sul e Sudeste do Brasil. As suas flores são amarelas com manchas bordo, que encantam por sua beleza e aroma forte de mel que se dissipa para a atração dos polinizadores. *B. schunkeana* está restrita ao Espírito Santo e é considerada a única orquídea negra natural, apresentando flores solitárias com cerca de 2 cm e forma touceira pequena (Barros *et al.*, 2012).

A propagação vegetativa das orquídeas nativas pode ocorrer pela separação de touceiras ou pequenas mudas formadas a partir do rizoma e a propagação sexuada, pela disseminação de sementes (Watanabe, 2002). Somente 5% destas sementes germinam, por várias causas como: ciclo de vida altamente especializado, com longo período vegetativo até o período reprodutivo, sementes com pouca ou nenhuma reserva, germinação de sementes dependente da associação micorrízica, e a ação do homem por meio da destruição de seu *habitat*, além da coleta indiscriminada de orquídeas na natureza. Já a propagação vegetativa é um processo lento que proporciona descendência genética semelhante a da planta matriz (Ferreira e Suzuki, 2008).

Os bancos de sementes ainda estão em estágio de desenvolvimento para espécies de orquídeas e, embora estas sejam extremamente conhecidas, ainda faltam estudos e informações gerais (Swarts e Dixon, 2009). Para isso há necessidade de realizar teste de viabilidade de sementes ao longo do tempo. O teste do 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio (TZ) tem sido usado para avaliar a viabilidade de muitas espécies de orquídeas. As condições recomendadas podem variar no que se refere ao tempo de exposição (24-48 h), pré-tratamento das sementes (escarificação com 10% de hipoclorito de sódio) e pré-condicionamento com açúcar (Hosomi *et al.* 2011, 2012). Entretanto, muitos estudos com espécies de Orchidaceae indicaram que esse teste não é

um bom indicador da germinabilidade, tendo que ser confirmado com testes de germinação, como foi constatado para híbridos de *Vanda* (Johnson e Kane, 2007). A germinação *in vitro* possibilita a expressão máxima do poder germinativo e vigor das sementes, sem interferências de agentes externos (Ferreira e Borghetti, 2004).

Estudos que tem como objetivo melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são importantes, não apenas para o conhecimento de seu cultivo, mas para preservá-las e com isso evitar sua extinção. O cultivo *in vitro* permite a melhoria da germinação de sementes de orquídeas, multiplicação dos indivíduos, além da produção de plantas com alta qualidade fitossanitária. Para realização deste processo as sementes são induzidas a germinação *in vitro* em condições especiais e mantidas em sala de crescimento em ambiente controlado (George *et al.*, 2008).

Segundo Pierik (1988), o meio Knudson C (Knudson, 1946) é muito utilizado para a germinação de orquídeas, assim como o meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Porém, para este, também é recomendada a sua formulação reduzida pela metade ou até $\frac{1}{4}$, tendo em vista que é um meio mais concentrado. O meio WPM (“woody plant medium” - Lloyd e McCown, 1980) também foi recomendado por Araújo *et al.* (2006) para propagação *in vitro* de plântulas de orquídea *Brassocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow*.

A técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas torna possível o aproveitamento máximo das sementes, pois quase 100% germinam. Porém, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização (Moraes *et al.*, 2002). A escolha do substrato para o transplântio das plântulas deve propiciar boas condições para o desenvolvimento durante a aclimatização (Moraes *et al.*, 2002). Vários substratos para orquídeas têm sido testados com intuito de encontrar substitutos ao xaxim, que era largamente utilizado. Alguns exemplos de substratos são esfagno, carvão, coco (fibra e pó) e Plantmax[®] (Macedo *et al.*, 2011).

A possibilidade de produzir plantas de orquídeas em grandes quantidades poderia garantir que essas plantas ocupem um lugar no futuro, evitando sua extinção (Suzuki e Ferreira, 2007). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a melhor temperatura e período de armazenamento

das sementes, estabelecer protocolo de germinação assimbiótica para produção de mudas em grande escala de *Brasiliorchis picta* e *Brasiliorchis schunkeana* e determinar metodologia para o transplante e aclimatização de mudas de *Brasiliorchis picta*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO

O trabalho foi realizado com plantas de *Brasiliorchis picta* e *B. schunkeana* provenientes da Mata Atlântica e cultivadas na casa de vegetação da Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e da coleção da Seção de Orquidário “Frederico Carlos Hoehne” do Instituto de Botânica de São Paulo (IBOT-SP). O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

2.2 POLINIZAÇÃO, COLETA, ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DAS SEMENTES

Foram realizadas polinizações cruzadas em flores de *B. picta* e *B. schunkeana*. Após aproximadamente seis meses foram obtidas cápsulas. Estas foram coletadas, acondicionadas em frascos de vidro e transportadas para o Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR, onde foram realizados os experimentos.

A secagem e o armazenamento das sementes seguiram o protocolo do projeto “Orchid Seed Storage for Sustainable Use” (OSSSU) conforme recomendação de Seaton e Ramsay (2005). A limpeza das cápsulas foi realizada com água corrente e sabão neutro, seguida de imersão em etanol 70% durante cinco minutos. Em seguida, os frutos foram cortados no sentido

longitudinal, as sementes raspadas sobre papel alumínio e posteriormente armazenadas em dessecador de vidro, contendo solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl_2) e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente sete dias. Após esse período, as sementes foram transferidas para pequenos frascos de vidro, etiquetados e armazenados em frascos de vidro maiores, contendo sílica gel e mantidas em freezer no Laboratório de Filogenia do Departamento de Botânica da UFPR durante um, três e seis meses em duas temperaturas (-20°C e -80°C). Para *B. picta* também foi testado o período de 12 meses.

2.3 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO*

As sementes de *Brasiliorchis picta* e *B. schunkeana*, foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% durante um minuto, seguido de imersão em solução de 0,75% de hipoclorito de sódio (NaClO), acrescido de 0,1% de Tween[®] 20 por cinco minutos. Em seguida foram realizadas seis lavagens com água destilada esterilizada.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 40 ml do meio de cultura. Foram testados quatro meios de cultura: MS, MS/2 (MS com a concentração de sais reduzida pela metade), KC e WPM. Os meios MS, MS/2 e WPM, acrescidos de ácido nicotínico ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e glicina (2 mg.L^{-1}). Os meios MS e MS/2 foram suplementados com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e o WPM com 1 mg.L^{-1} de tiamina. No meio KC não foram adicionadas vitaminas e aminoácidos. Os meios foram suplementados com $5,6 \text{ g L}^{-1}$ de ágar Himedia[®], 30 g L^{-1} de sacarose e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de mio-inositol. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Foram colocadas aproximadamente 500 sementes por placa de Petri, nas quais foram marcadas quatro regiões distintas, contendo 100 sementes para a contagem de 400 sementes por placa e três repetições. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam rizóide e ápice.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $30 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos foram submetidos ao Teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE *Brasiliorchis picta*

Plântulas de cinco meses de idade obtidas após a germinação *in vitro* foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo os substratos Plantmax[®], vermiculita e coco em pó. Estes substratos foram testados separadamente e combinados entre si sendo: T1 Plantmax[®], T2 vermiculita, T3 coco em pó, T1+T2 (1:1), T1+T3 (1:1), T2+T3 (1:1) e T1+T2+T3 (1:1:1). Após 90 dias foi observada a porcentagem de sobrevivência. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 plântulas por substrato e seis repetições, totalizando 60 plântulas com aproximadamente 3 cm de comprimento por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett e análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Brasiliorchis picta*

A análise de variância revelou que houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre períodos de armazenamento e os meios de cultura para a porcentagem de germinação das sementes armazenadas a -20°C (ANEXO 1).

Para as sementes sem armazenamento e para as armazenadas a -20°C em todos os períodos testados observou-se que os meios WPM e MS apresentaram os melhores resultados de germinação (TABELA 1).

As sementes germinadas nos meios WPM apresentaram redução da germinação após seis e 12 meses de armazenamento enquanto essa queda ocorreu só após 12 meses nas sementes cultivadas no meio MS. No entanto, as porcentagens de germinação das sementes mantidas nos meios WPM e MS foram elevadas (76%), mesmo após 12 meses de armazenamento (TABELA 1).

Os meios que apresentaram as menores porcentagens de germinação foram os meios KC e MS/2. Observou-se uma pequena redução gradativa na viabilidade das sementes, após o armazenamento em todos os meios testados (TABELA 1) (FIGURA 2).

TABELA 1- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Brasiliorchis picta*, SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Meios de cultura	Período de armazenamento (meses)					Média
	S/a	1	3	6	12	
Germinação (%)						
KC	71,67 a C	70,42 ab B	66,75 bc B	65,25 c B	63,92 c C	67,60
MS	80,42 ab B	82,25 a A	82,17 a A	79,75 ab A	76,50 b A	80,22
MS/2	72,50 a C	72,83 a B	72,58 a B	65,17 b B	69,83 ab B	70,58
WPM	86,08 a A	81,42 a A	81,75 a A	76,08 b A	76,00 b A	80,27
Média	77,67	76,73	75,81	71,56	71,56	

* Sem armazenamento.

** Letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os dados da análise de variância indicaram que houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre períodos de armazenamento e os meios de cultura para a porcentagem de germinação de sementes armazenadas a -80°C (ANEXO 2). Para as sementes armazenadas a -80°C , observou-se uma redução nas porcentagens de germinação, independente do período de armazenamento, quando comparadas com as sementes submetidas a temperatura de -20°C .

As maiores porcentagens de germinação também foram obtidas nos meios WPM e MS. Para os meios MS, MS/2 e WPM houve uma redução gradativa na germinação após um mês e para o KC, após três meses de armazenamento. A menor taxa foi observada aos 12 meses com 60,42% das sementes germinadas em meio MS/2 (TABELA 2) (FIGURA 2).

TABELA 2- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Brasiliorchis picta*, SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -80°C EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Meios de cultura	Período de armazenamento (meses)					Média
	S/a	1	3	6	12	
	Germinação (%)					
KC	71,67 a C	71,75 a B	69,42 ab B	63,92 c B	65,50 bc B	68,45
MS	80,42 a B	78,58 a A	71,83 b B	73,42 b A	69,97 b A	74,84
MS/2	72,50 a C	73,75 a B	64,67 bc C	67,42 b B	60,42 c C	67,75
WPM	86,08 a A	82,00 a A	77,08 b A	71,83 c A	68,42 c AB	77,08
Média	77,67	76,52	70,75	69,15	66,08	

* Sem armazenamento.

** Letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

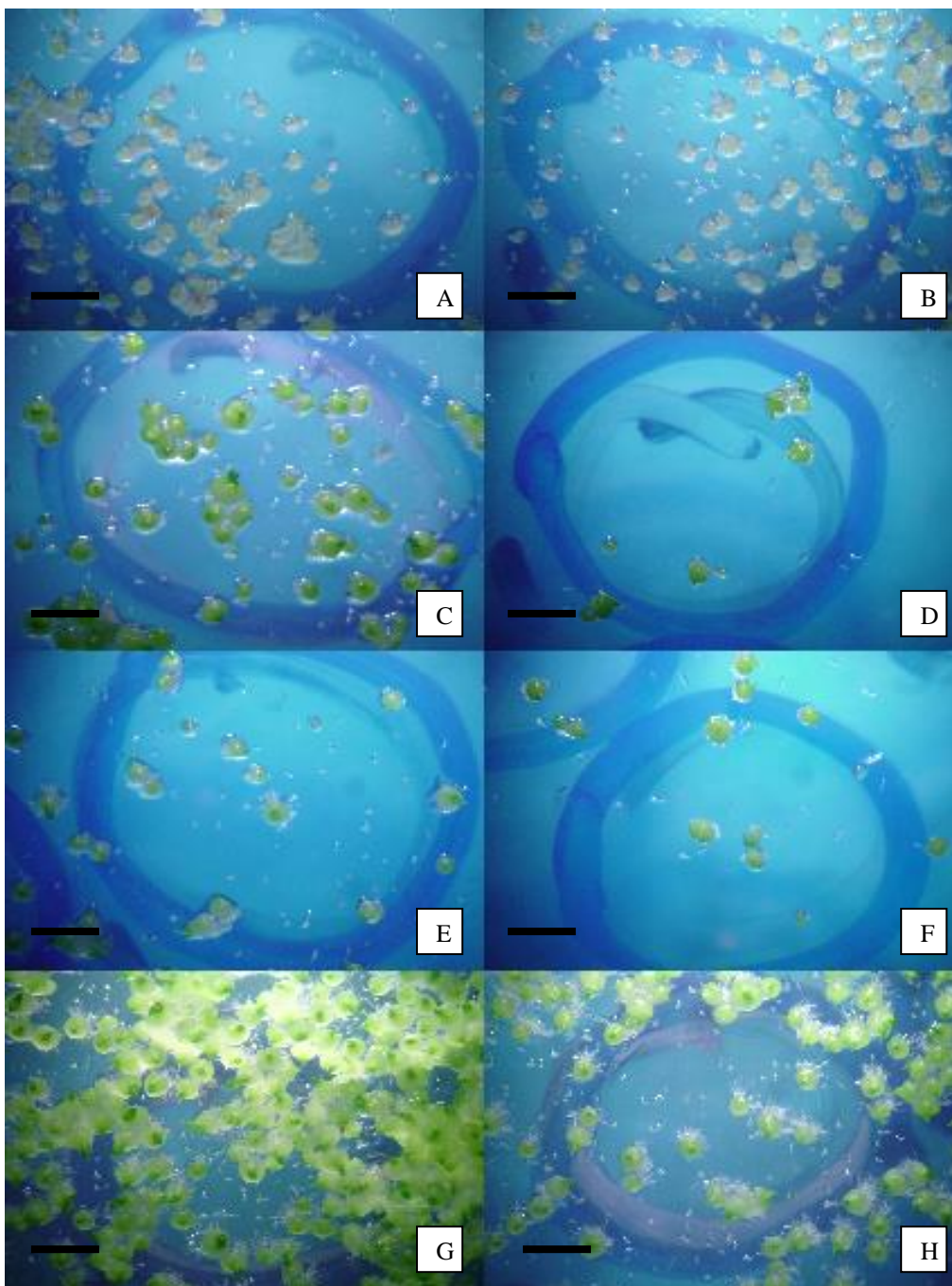


FIGURA 2- SEMENTES DE *Brasiliorchis picta* GERMINADAS A 60 DIAS NOS MEIOS DE CULTURA: A- KC (-20°C); B- KC (-80°C); C- MS (-20°C); D- MS (-80°C); E- MS/2 (-20°C); F- MS/2 (-80°C); G- WPM (-20°C); H- WPM (-80°C). BARRAS = 0,3 cm.

3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana*

A análise de variância indicou que não houve interação significativa ($p \geq 0,05$) entre os meios de cultura e os períodos de armazenamento para a porcentagem de germinação de sementes armazenadas a -20°C. (ANEXO 3).

As melhores respostas de germinação de sementes ocorreram nos meios WPM e MS, sendo significativamente superiores às dos meios KC e MS/2, como também ocorreu para *B. picta*. As sementes não armazenadas apresentaram as maiores porcentagens, ocorrendo uma redução significativa com o aumento do período de armazenamento a -20°C (TABELA 3).

TABELA 3- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana*, SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C.

Meios de cultura	Período de armazenamento (mês)				
	S/a*	1	3	6	Média
	Germinação (%)				
KC	75,50	70,00	60,33	57,67	65,88 b
MS	78,75	75,58	70,00	68,08	73,10 a
MS/2	70,58	66,42	59,92	57,00	63,48 b
WPM	80,50	74,92	71,25	66,33	73,25 a
Média	76,33 A	71,73 B	65,38 C	62,27 D	

* Sem armazenamento.

** Letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Da mesma forma do que ocorreu com as sementes armazenadas a -20°C, não houve a interação entre meio de cultura e tempo de armazenamento a - 80°C para a porcentagem de sementes armazenadas a - 20°C. (ANEXO 4). Os melhores meios de cultura foram WPM e MS, com porcentagens mais elevadas que os meios MS/2 e KC. As sementes não armazenadas apresentaram a maior porcentagem de germinação, seguida da dos períodos 1, 3 e 6 meses a - 80°C, quando houve uma pequena redução na germinação das sementes (TABELA 4) (FIGURA 3).

Como também ocorreu com *B. picta*, as porcentagens de germinação obtidas após armazenamento a - 80°C foram inferiores às de - 20°C.

TABELA 4- PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana*, SEM ARMAZENAMENTO E APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO A -80°C.

Meios de cultura	S/a*	Período de armazenamento (mês)			Média
		1	3	6	
Germinação (%)					
KC	75,50	66,00	58,08	55,58	63,79b
MS	78,75	71,00	63,58	63,67	69,25a
MS/2	70,58	63,67	57,83	55,67	61,94b
WPM	80,50	68,17	63,75	61,17	68,40a
Média	76,33 A	67,21 B	60,81 C	59,02 C	

* Sem armazenamento

** Letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

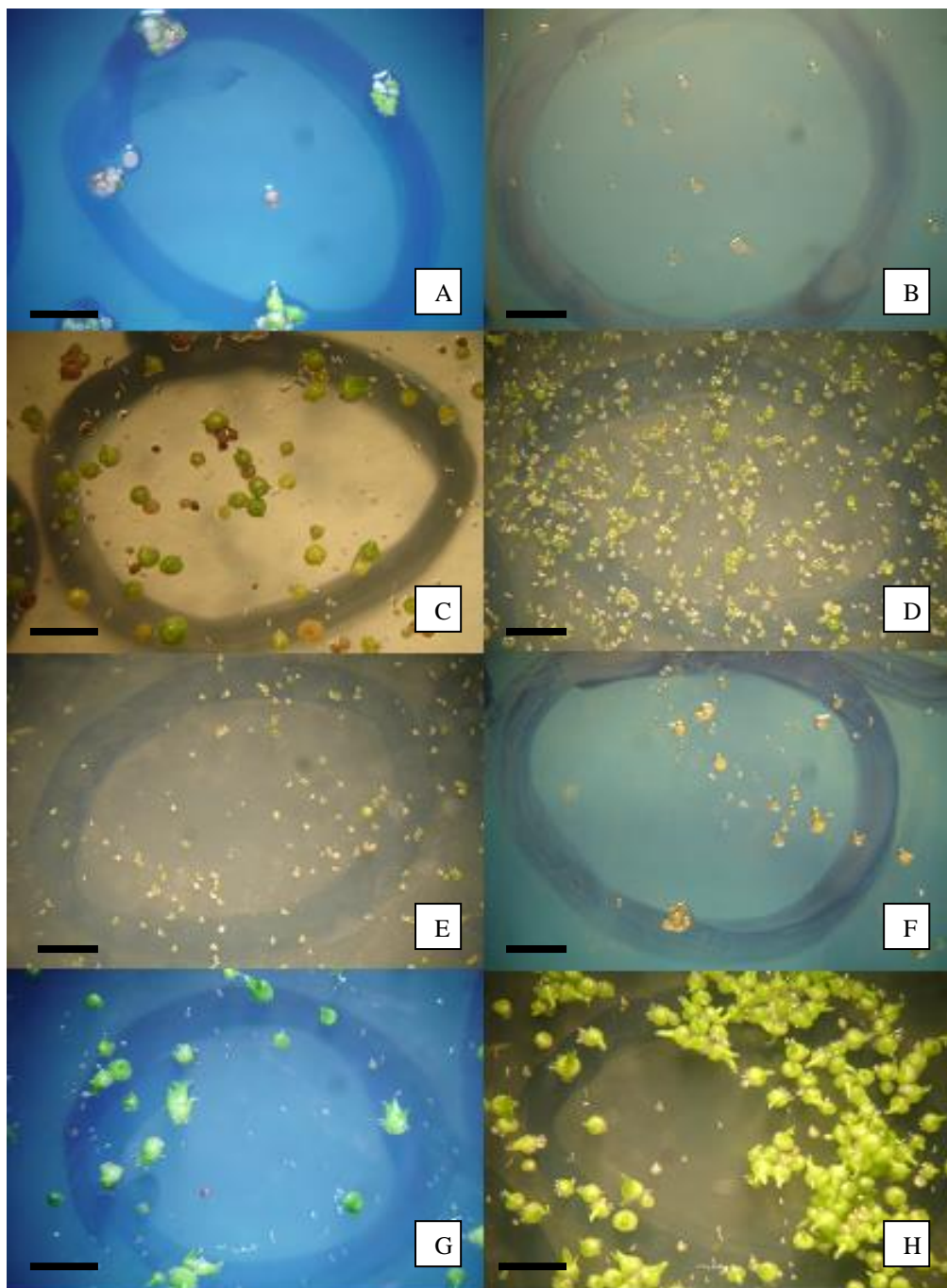


FIGURA 3- SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana* GERMINADAS A 60 DIAS NOS MEIOS DE CULTURA: A- KC (-20°C); B- KC (-80°C); C- MS (-20°C); D- MS (-80°C); E- MS/2 (-20°C); F- MS/2 (-80°C); G- WPM (-20°C); H- WPM (-80°C). BARRAS = 0,3 cm.

3.3 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE *Brasiliorchis picta*

A análise estatística das porcentagens de sobrevivência das plântulas de *B. picta* indicou diferenças significativas entre os substratos (ANEXO 5).

Observou-se que os melhores substratos para o transplântio foram vermiculita e a mistura de vermiculita com os demais substratos. A maior mortalidade ocorreu no Plantmax® (TABELA 5).

TABELA 5- SOBREVIVÊNCIA DE PLÂNTULAS DE *B. picta* MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, APÓS 90 DIAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS.

Substratos	Sobrevivência (%)
Plantmax (T1)	50,00 e
Vermiculita (T2)	96,67 a
Coco em pó (T3)	66,67 cd
T1+T2 (1:1)	60,00 de
T1+T3 (1:1)	36,67 f
T2+T3(1:1)	76,67 bc
T1+T2+T3 (1:1:1)	86,67 ab
Plantmax (T1)	50,00 e

*Letras iguais minúsculas na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A germinação de sementes de *Brasiliorchis picta* e *B. schunkeana* ocorreu em todos os meios testados variando de 55 a 80%, independente da temperatura e do tempo de armazenamento. Os melhores resultados ocorreram nos meios WPM e MS e os piores nos meios de cultura KC, indicado para orquídeas, e MS/2. Os meios testados diferiram na sua composição química, enquanto o MS é muito rico em macro e micronutrientes, o KC comparativamente contém baixa concentração de nutrientes e não tem vitaminas (ANEXOS 7 E 8). Especialmente no caso do meio KC, observou-se que os protocormos formados a partir de sementes germinadas não eram vigorosos e apresentavam coloração amarelada quando comparados com os dos demais meios de cultura. Ferreira (2012) também obteve o pior resultado de germinação assimbiótica de *Epidendrum secundum* em meio de cultura KC. A falta de vigor dos explantes observada pode ser devida à falta de vitaminas,

inositol e as concentrações baixas de micronutrientes como boro, zinco e molibdênio (Ferreira, 2012).

Por outro lado, para a germinação de sementes das duas espécies observaram-se elevadas porcentagens no meio de cultura WPM, que contém concentrações reduzidas de nutrientes e apenas a tiamina apresenta concentração 10 vezes superior à da formulação do MS. Resultado semelhante foi obtido para *Epidendrum secundum* em que o meio WPM demonstrou a maior porcentagem de germinação ao longo do período de armazenamento. Segundo Ferreira (2012), esse meio contém concentrações intermediárias de íons importantes como K^+ , Ca^+ , NH_4^+ e NO_3^- , evitando um possível excesso ou falta de sais.

Os melhores resultados de germinação foram obtidos nos meios WPM e MS, nas sementes não armazenadas, seguido das armazenadas na temperatura de $-20^\circ C$, ocorrendo uma redução gradativa com o aumento do período de armazenamento de até seis meses para *B. schunkeana* e 12 meses para *B. picta*. Segundo Seaton (2007), as temperaturas de -18 a $-20^\circ C$ permitem um aumento na longevidade das sementes, quando comparadas a de $5^\circ C$.

Além disso, observou-se que o armazenamento a $-20^\circ C$ foi mais eficiente do que em $-80^\circ C$, visto que a taxa de germinação foi relativamente superior para *B. picta* e *B. schunkeana*. Resultado semelhante foi observado por Hay *et al.* (2010) que testaram várias temperaturas para armazenamento de sementes, entre $23^\circ C$ e $-196^\circ C$. Segundo estes autores, a temperatura de $-20^\circ C$ foi ideal para a manutenção da viabilidade de sementes de várias espécies de orquídeas, como por exemplo, *Diuris laxiflora*. Resultado semelhante ao de *B. picta* foi obtido por Ferreira (2012) que constatou que as sementes de *Epidendrum secundum* podem ser armazenadas por um ano a $-20^\circ C$.

A pequena redução gradativa na viabilidade das sementes de *B. picta* e *B. schunkeana* após armazenamento poderia ser explicada também pelo fato de ocorrer o envelhecimento e a degradação das sementes de orquídeas devido ao seu pequeno conteúdo de reservas, sendo basicamente constituídas de ácidos graxos (Stancato *et al.*, 1998), como foi relatado por Ferreira (2012).

Porém, esse resultado indicou a possibilidade de manter as duas espécies em banco de sementes, pois após 12 meses de armazenamento de *B. picta* e seis meses de *B. schunkeana* obteve-se 76% e 67% de germinação, respectivamente, nos meios WPM e MS. Tendo em vista que a redução na viabilidade após armazenamento foi pequena e que as cápsulas possuem milhares de sementes, a manutenção dessas espécies em bancos de sementes permitirá a produção de mudas em larga escala.

Para a aclimatização das plantas de *Brasiliorchis picta*, observou-se que a vermiculita foi o melhor substrato, uma vez que ocorreu 96% de sobrevivência após três meses de plantio. Faria *et al.* (2001) obtiveram resultados superiores mediante a substituição do xaxim por vermiculita no cultivo de *Oncidium baueri* e pelas misturas de vermiculita + carvão e vermiculita + palha de arroz carbonizada no cultivo da espécie *Maxillaria picta*. No entanto, para plântulas de *Dendrobium nobile*, os substratos vermiculita + casca de arroz carbonizada e somente vermiculita, não foram recomendados para a aclimatização (Moraes *et al.*, 2002). Rego *et al.* (2000) sugeriram para o cultivo de *Oncidium sarcodes* e *Schomburgkia crispaa* substituição do xaxim por misturas de casca de pinus, isopor, carvão vegetal, vermiculita e casca de arroz.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente trabalho que a germinação *in vitro* mostrou-se eficiente para *Brasiliorchis picta* e *B. schunkeana*, visto que as sementes germinadas deram origem a novas plantas, permitindo a produção em larga escala de mudas. Para tanto, indica-se para a germinação das sementes das espécies nos meios MS e WPM. Também recomenda-se que o armazenamento destas sementes seja feito a -20°C por até 12 meses para *B. picta* e de até seis meses para *B. schunkeana*.

A aclimatização de mudas de *B. picta* pode ser realizada com eficiência utilizando como substrato vermiculita.

REFERENCIAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; VILLA, F.; ROCHA, H. S.; COSTA, F. C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídeas em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. *Plant Cell Culture*, v.2, n.2, p.68-73, 2006.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N. Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.
- FARIA, R. T. D., REGO, L. D. 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.
- FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- FERREIRA, D. L. *Banco de sementes e sistemas de propagação in vitro como estratégia de conservação para Bulbophyllum peri Schlt. e Epidendrum secundum Jacq.* Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M.I.B.; BASEIA, I.G.; LINCHSTON, J.E.(orgs.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Natal: Imagem Gráfica, 2008. p.67-68.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. *Plant propagation by tissue culture*. 3 ed. v.1. Dordrecht: Springer, 2008. p. 46.
- HAY, F. R.; MERRITT, D. J.; SOANES, J. A.; DIXON, K. W. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.164, p.26-41, 2010.

HOSOMI, S. T. *Germinação, viabilidade e armazenamento de sementes de Cattleya (Orchidaceae)*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2009. 57p.

HOSOMI, S. T.; SANTOS, R. B.; CUSTODIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B.. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.

HOSOMI, S. T.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 48, n. 1, p. 127-136, 2012.

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

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

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E. Asymbiotic germination of ornamental Vanda: *in vitro* germination and development of three hybrids. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, v. 91, n. 3, p. 251-261, 2007.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, v.15, p.416, 1980.

MACEDO, M. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JÚNIOR, E. J.; VIEIRA, M. C.; TATARA, M. B. Substratos e intensidades de luz no cultivo de orquídea denfal. *Horticultura Brasileira*, v.29, p. 168-173, 2011.

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*, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

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

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

REGO, L.V. et al. Desenvolvimento vegetativo de genótipos de orquídeas Brasileiras em substratos alternativos ao xaxim. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 6, n. 1-2, p. 75-79, 2000.

SEATON, P. T.. Orchid conservation: where do we go from here. *In: Proceedings of 3rd International Orchid Conservation Congress/2nd International Conference on Neotropical Orchidology. Lankesteriana*, v.7, p.13-16, 2007.

SEATON, P. T.; RAMSAY, M. *Growing orchids from seed*. Royal Botanic Gardens, Kew. 2005.

STANCATO, G. C.; CHAGAS, E. P.; MAZZAFERA, P. Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana*, v.13, p.97–100, 1998.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, v.14, p.590–598, 2009.

SUZUKI, R. M.; FERREIRA, W. M. Introdução às técnicas de micropropagação de orquídeas. *In: BARBOSA, L.M. e SANTOS-Jr N.A. (orgs.). A Botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. 1 ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 2007. p. 655-659.

WATANABE, D. *Orquídeas: manual de cultivo*. 2. ed. São Paulo: AOSP, p.296, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis picta* ARMAZENADAS A -20°C.

Variável	GL	F	P
Tempo	4	20,85	<0,05
Meios	3	139,62	<0,05
Interação	12	2,40	<0,05

CV(%): 5,84

ANEXO 2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis picta* ARMAZENADAS A -80°C.

Variável	GL	F	P
Tempo	4	76,27	<0,05
Meios de cultura	3	83,12	<0,05
Interação	12	4,60	<0,05

CV(%): 5,46

ANEXO 3 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana* ARMAZENADAS A -20°C.

Variável	GL	F	P
Tempo	3	93,36	<0,05
Meios de cultura	3	58,64	<0,05
Interação	9	1,50	<0,05

CV(%): 6,57

ANEXO 4 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Brasiliorchis schunkeana* ARMAZENADAS A -80°C.

Variável	GL	F	P
Tempo	3	128,18	<0,05
Meios de cultura	3	26,22	<0,05
Interação	9	1,03	<0,05

CV(%): 7,27

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A SOBREVIVÊNCIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS DE *Brasiliorchis picta* APÓS 90 DIAS.

Variável	G.L	F	P
Substratos	6	64,34	<0,001
CV% 6,67			

ANEXO 6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO EM mg L⁻¹

Componentes	MS (1962)	MS/2	Woody Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980)	Knudson (Arditti, 1982)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370	250
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	96	-
KNO ₃	1900	950	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	1000
NH ₄ NO ₃	1650	825	400	-
KH ₂ PO ₄	170	85	170	250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,3	13,9	27,8	25
Na ₂ EDTA	37,3	18,65	33,6	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	22,3	7,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3	8,6	0,331
MoO ₃	-	-	-	0,016
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,012	0,25	0,0624
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,012	-	-
KI	0,83	0,41	-	-
H ₃ BO ₃	6,2	3,1	6,2	0,056
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,12	0,25	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5	-
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	-
Tiamina HCl	0,1	0,1	1	-
Glicina	2	2	2	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000
Ágar	5600	5600	5600	5600

ANEXO 7 COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MACRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO.

Meios de Cultura	K ⁺	Ca ₂ ⁺	Mg ₂ ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻	H ₂ PO ₄
WPM	12,6	3,0	1,5	5,0	9,7	7,4	0,1
MS	20,0	3,0	1,5	20,0	39,4	1,6	1,3
MS/2	10,0	1,5	0,8	10,0	19,7	0,8	0,7
KC	1,8	4,2	1,0	7,6	8,4	4,8	1,8

ANEXO 8 COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO

MICRONUTRIENTES (μM)										
Meios de Cultura	Fe	B	Mn	Zn	I	Na⁺	Cu	Co	Mo	Cl
WPM	100,00	100,00	130,00	30,00	-	2,4	1,00	-	1,10	0,2
MS	100,00	100,30	100,00	30,00	5,00	0,2	0,10	0,105	1,00	6,0
MS/2	50,00	50,00	50,00	15,00	2,50	0,1	0,05	0,05	0,50	3,0
KC	90,00	0,90	44,40	1,15	-	-	0,25	-	0,11	-

CAPÍTULO III

**Micropropagação de *Brasiliorchis picta* (Hook.)
R.B.Singer *et al.* e *Mormolyca rufescens* (Lindl.)
M.A.Blanco (Orchidaceae) utilizando a técnica “thin cell
layer” (TCL)**

RESUMO

Brasiliorchis picta e *Mormolyca rufescens* são espécies herbáceas, epífitas e seus domínios fitogeográficos englobam o bioma Mata Atlântica. Estudos que tem como objetivo melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são importantes para sua preservação. A principal vantagem do cultivo de folhas *in vitro* é que a remoção dos explantes não danifica a planta doadora e sua disponibilidade independe das estações do ano. A técnica “thin cell layer” (TCL) vem sendo utilizada com sucesso para plantas ornamentais e tem se mostrado promissora quando comparada às técnicas de cultura de tecidos convencionais. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação utilizando a técnica TCLt a partir de explantes foliares de *B. picta* e *M. rufescens* para produção de mudas em grande escala. Foram utilizadas folhas de aproximadamente 1 cm de comprimento, inteiras e seccionadas em 6 partes (B1, B2, M1, M2, A1 e A2) obtidas de plântulas de três meses germinadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS/2, contendo BAP (2,5, 5 e 10 μM) ou TDZ (3, 6 e 9 μM) durante 90 dias. Ocorreu regeneração direta de PLBs nos explantes foliares, com maior frequência para *B. picta* do que para *M. rufescens*. O melhor resultado de folhas inteiras de *B. picta* ocorreu em meio contendo 10 μM de BAP (70% de regeneração e 13,2 PLBs por explante). As folhas inteiras de *M. rufescens* e TCLts das duas espécies apresentaram maiores porcentagens de regeneração de PLBs em meio contendo 9 μM de TDZ. A região basal dos explantes foliares foi mais responsiva, seguida da apical. Com isso, conclui-se que a técnica TCL pode ser utilizada com sucesso para a propagação clonal de *B. picta* e *M. rufescens*.

Palavras-chave: BAP, folhas, propagação *in vitro*, TDZ

ABSTRACT

Brasiliorchis picta and *Mormolyca rufescens* are herbaceous epiphytes species, and their phytogeographic domain encompass the biome of the Atlantic Forest. Studies that aim to improve the process development and propagation of orchids are important for their preservation. The main advantage of growing leaves *in vitro* is that the removal of the explants does not damage the donor plant and its availability is independent of the seasons. The technique “thin cell layer” (TCL) has been successfully used for ornamental plants and showed itself as promising when compared to techniques of conventional tissue culture. This study aimed to establish a protocol for micropropagation using the TCLt technique from foliar explants of *B. picta* and *M. rufescens* for production of seedlings on a large scale. Leaves of approximately 1 cm of length, whole and sectioned into 6 parts (B1, B2, M1, M2, A1 and A2) obtained from three month seedlings germinated *in vitro*. The explants were cultivated in MS/2 medium, containing BAP (2,5, 5 and 10 μM) or TDZ (3, 6 and 9 μM) during 90 days. Direct regeneration of PLBs in the foliar explants, occurred with larger frequency for *B. picta* than for *M. rufescens*. The best result of whole leaves of *B. picta* occurred in medium supplemented with 10 μM BAP (70% of regeneration and 13,2 PLBs per explants). The whole leaves of *M. rufescens* and TCLts of the two species showed larger percentages of regeneration of PLBs in ambient containing 9 μM of TDZ. The basal region of the foliar explants was more responsive, followed by the apical one. It can be concluded that the TCL technique can be used with success for the clonal propagation of *B. picta* and *M. rufescens*.

Key-words: BAP, leaves, *in vitro* propagation, TDZ.

1 INTRODUÇÃO

Brasiliorchis picta (Hook.) R. B. Singer et al. e *Mormolyca rufescens* (Lindl.) M. A. Blanco são espécies herbáceas, epífitas e seus domínios fitogeográficos englobam o bioma Mata Atlântica. *B. picta* apresenta uma flor solitária, amarela com manchas bordô e é característica por seu forte aroma de mel. *M. rufescens* também apresenta flores solitárias, de coloração amarela clara, com labelo avermelhado, com aproximadamente 3 cm e haste de aproximadamente 10 cm (Barros *et al.*, 2012).

Estudos que tem como objetivo melhorar o processo de propagação e desenvolvimento de orquídeas são importantes, não apenas para o conhecimento de seu cultivo, mas também para preservá-las e com isso evitar sua extinção. Para tanto, as técnicas de cultivo *in vitro* são comprovadamente eficientes para a melhoria da germinação de sementes de orquídeas, na multiplicação dos indivíduos, além da produção de plantas com alta qualidade fitossanitária. Neste processo as sementes são induzidas a germinação em meio de cultura em condições assépticas, mantidas em sala de crescimento, onde fatores ambientais como luz e temperatura são adequadamente controlados (George *et al.*, 2008).

Para a micropropagação de orquídeas, podem ser utilizados diferentes tipos de explantes como ápices radiculares, protocormos e folhas jovens, que são inoculados em condições e meios de cultura adequados (Kerbaui, 1993; Chen e Chang, 2002). A principal vantagem do cultivo de folhas *in vitro* é que a remoção dos explantes não danifica a planta doadora (Park *et al.*, 2000; Arditti, 2008). Além disso, a sua disponibilidade é independente das estações do ano diferentemente do que ocorre com inflorescências (Chung *et al.*, 2009).

O sucesso da micropropagação utilizando explantes foliares depende de muitos fatores como composição do meio de cultura, fonte da folha (*in vitro* /*in vivo*), parte retirada da folha, orientação do explante e principalmente a idade da folha (Chung *et al.*, 2009). Além disso, também são importantes as combinações de fitorreguladores em concentrações adequadas que estimulem a formação de protocormos e o desenvolvimento das plântulas (Singh, 1992).

A técnica “thin cell layer” (TCL) vem sendo utilizada com sucesso para plantas ornamentais e tem se mostrado promissora quando comparada às técnicas de cultura de tecidos convencionais. Consiste em utilizar pequenos explantes retirados de diferentes órgãos da planta (caules, folhas, inflorescências, órgãos florais e embriões), seccionados em posição longitudinal ou transversal (Teixeira da Silva, 2010). Essa técnica tem se mostrado eficiente para regeneração de orquídeas, dando origem a estruturas denominadas “protocorm like bodies” (PLBs). De acordo com Arditti e Ernst (1993), podem ser formados a partir de tecidos e calos de orquídeas, sendo caracterizados como uma estrutura semelhante ao protocormo originado da germinação.

A técnica TCL tem se mostrado eficiente utilizando como explantes ápices foliares de *Oncidium flexuosum*, com 80% dos explantes regenerando PLBs em meio de cultura MS/2, contendo 1,5 μM de tidiazuron (TDZ) e mantidos no escuro (Mayer *et al.*, 2010). Secções foliares de 1 mm de espessura do híbrido *Doritaenopsis*, cultivadas em meio de cultura MS/2, contendo 9 μM de TDZ, obtiveram a maior percentagem de formação de PLBs (72,3%) e o maior número de PLBs por explante (18). No entanto, com TCLt de 5 mm de espessura, a resposta foi bem inferior para a formação de PLBs (20% e 4,3 por explante) nas mesmas condições de cultivo (Park *et al.*, 2002).

Ainda não há registro de estudos com técnicas *in vitro* que visam a obtenção de protocolo regenerativo de mudas de *Brasiliorchis picta* e *Mormolyca rufescens*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação utilizando a técnica TCL a partir de explantes foliares de *Brasiliorchis picta* e *Mormolyca rufescens* para produção de mudas em grande escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE CULTIVO

O trabalho foi realizado com *Brasiliorchis picta* e *Mormolyca rufescens*, provenientes da Mata Atlântica e cultivadas na casa de vegetação da Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e da coleção da Seção de Orquidário “Frederico Carlos Hoehne” do Instituto de Botânica de São Paulo (IBOT-SP).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE *Brasiliorchis picta* E *Mormolyca rufescens*

2.2.1 Indução e regeneração de PLB's a partir de folhas inteiras

Plântulas de *B. picta* e *M. rufescens* obtidas após três meses da germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. As duas primeiras folhas formadas, medindo aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em placas de Petri (100 mm de diâmetro e 20 mm de altura) contendo 40 ml de meio de cultura MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade), acrescido de ácido nicotínico (0,5 mg.L⁻¹), piridoxina (0,5 mg.L⁻¹), glicina (2 mg.L⁻¹) e tiamina (0,1 mg.L⁻¹). Para este experimento foram testadas as concentrações de 3, 6, e 9 µM de TDZ ou de 2,5; 5 e 10 µM de BAP. Para todos os tratamentos foi realizado um controle sem citocininas. O meio foi suplementado com 5,6 g L⁻¹ de ágar Himedia®, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados a 121°C por 20 minutos em autoclave.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo inoculadas 10 folhas por placa de Petri, com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura e cada tratamento foi constituído de três repetições.

A avaliação da porcentagem de explantes com regeneração de PLBs e número médio de PLBs formados por explante foi realizada aos 90 dias.

2.2.2 Indução e regeneração direta de PLB's a partir de explantes foliares utilizando a técnica TCL

Plântulas de *B. picta* e *M. rufescens* obtidas após três meses da germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Seis secções transversais de 1 mm de espessura da folha (B1 e B2 – base, M1 e M2- parte mediana e A1 e A2 - ápice) foram inoculadas em placas de Petri, contendo 40 ml de meio de cultura MS/2, acrescido de 3, 6 e 9 μM de TDZ ou BAP nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM (FIGURA 4). Para todos os tratamentos foi realizado um controle sem a adição de citocininas.

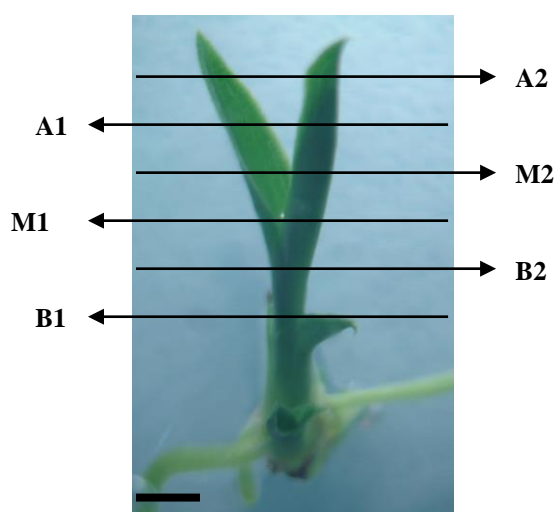


FIGURA 4- POSIÇÃO DAS SECÇÕES DE TCLts ("THIN CELL LAYER"), MEDINDO APROXIMADAMENTE 1 MM DE ESPESSURA, REALIZADOS NAS FOLHAS DE *Brasiilorchis picta* e *Mormolyca rufescens*, MEDINDO ATÉ 1 CM DE COMPRIMENTO, APÓS 3 MESES DA GERMINAÇÃO *IN VITRO*. **B1** E **B2** - BASE DA FOLHA, **M1** E **M2**- PARTE MEDIANA DA FOLHA, **A1** E **A2** - ÁPICE DA FOLHA. BARRA= 0,5 cm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de sete tratamentos, com três repetições, sendo dez explantes de cada uma das seis regiões da folha (B1, B2, M1, M2, A1 e A2) totalizando 60 explantes por placa de Petri. A avaliação da porcentagem de explantes com regeneração de PLBs e do número médio de PLBs formados por explante foi realizada após

90 dias. Valores de número médio foram transformados por $\sqrt{x+0,5}$ e porcentagem por $\log x+0,5$. Os explantes que regeneraram PLBs foram transferidos para o meio de cultura sem reguladores vegetais para alongamento e enraizamento.

2.2.3 Meio de cultura e condições de cultivo

Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 40 ml do meio de cultura MS/2 (MS com a concentração de sais reduzida pela metade), acrescido de ácido nicotínico ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina (2 mg.L^{-1}) e tiamina ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). O meio foi suplementado com $5,6 \text{ g L}^{-1}$ de ágar Himedia®, 30 g L^{-1} de sacarose e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N e os meios esterilizados a 121°C por 20 minutos em autoclave.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $18\pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $30 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3 RESULTADOS

3.1 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBs A PARTIR DE FOLHAS INTEIRAS DE *Brasiliorchis picta*

A análise de variância da porcentagem de explantes formando PLBs e do número médio de PLBs por explante indicou que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p\geq 0,05$) (ANEXO 1).

As melhores respostas de regeneração de PLBs foram obtidas com $5 \mu\text{M}$ de BAP e $9 \mu\text{M}$ de TDZ (TABELA 1). No entanto, os números médios de PLBs, foram maiores com as concentrações intermediárias de BAP ($5 \mu\text{M}$) e

TDZ (6 μM). As duas variáveis analisadas indicaram que é necessário a adição de citocinina, pois no controle ocorreram as piores respostas (TABELA 1).

Para esta espécie também observou-se que a base da folha foi o local que apresentou maior regeneração, apesar de também ocorrer PLBs ao longo da folha, porém em menor quantidade (FIGURA 5).

TABELA 1- EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE FOLHAS DE *Brasiliorchis picta*, APÓS 90 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS/2, ACRESCIDO DE CITOCININAS.

Citocininas (μM)	Explantos regenerando PLBs (%)	Número médio de PLBs
Controle	30,0	2,0
BAP 2,5	40,0	2,1
BAP 5	70,0	13,2
BAP 10	60,0	7,1
TDZ 3	53,3	8,2
TDZ 6	53,3	11,4
TDZ 9	60,0	9,0
Média	52,4	7,6

ns- Não significativo pelo teste F da análise de variância.

3.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBs A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Brasiliorchis picta* UTILIZANDO A TÉCNICA “THIN CELL LAYER” (TCL)

A análise indicou que houve interação entre regulador vegetal e região da folha ($p \leq 0,05$) para a porcentagem de explantes regenerando PLBs (ANEXO 2).

A indução de PLBs ocorreu com maior frequência nos explantes foliares da região basal (B1), seguido da B2, sendo significativamente superior à da apical, com exceção da obtida na concentração mais elevada de TDZ. Os TCLts da região mediana responderam muito pouco (FIGURA 5). As melhores respostas ocorreram em meio de cultura suplementados com TDZ e com a maior concentração testada (9 μM), apesar de não haver diferença significativa das regiões B1 e B2 (TABELA 2).

TABELA 2- AVALIAÇÃO DOS EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBS A PARTIR DE TCLTS FOLIARES DE *Brasiliorchis picta*. CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.

Citocininas (μM)	Explantos que regeneraram PLBs (%)						Média
	B1	B2	M1	M2	A1	A2	
Controle	26,7 a A	10,0 bc A	-	-	-	-	6,1
BAP 2,5	40,0 a A	13,3 c B	-	-	-	-	8,9
BAP 5	43,3 a A	23,3 abc A	-	-	-	3,3 bc B	11,7
BAP 10	36,7 a A	30,0 ab A	-	-	-	3,3 bc B	11,7
TDZ 3	43,3 a A	30,0 ab A	-	-	-	15,0 ab B	14,7
TDZ 6	46,7 a A	36,7 a AB	-	3,3 a C	-	16,7 a B	17,2
TDZ 9	46,7 a A	40,0 a A	3,3 a B	3,3 a B	3,3 a B	23,3 a A	20,0
Média	40,5	26,2	0,5	0,9	0,5	8,8	

Letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

TCLt da folha - B1-B2- região basal, M1-M2 – região mediana e A1-A2 – região apical.

Para o número médio de PLBs regenerados por explante, houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre a citocinina utilizada e a região da folha (ANEXO 3). Os melhores resultados foram com TCLts da região basal B1, seguido da B2 e A2 (FIGURA 5). As melhores respostas também ocorreram com as concentrações mais elevadas de TDZ para B1 e A2 (6 e 9 μM). (TABELA 3). As secções medianas das folhas responderam muito pouco e somente nos meios acrescidos das concentrações mais elevadas de TDZ (6 e 9 μM) (TABELA 3).

Os resultados indicaram que é necessária a adição de citocinina ao meio de cultura para organogênese a partir de TCLt de folhas e, nos tratamentos com BAP, observou-se necrose dos PLBs aos 90 dias.

TABELA 3- AVALIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE PLBS REGENERADOS POR EXPLANTE A PARTIR DE TCLTS FOLIARES DE *Brasiliorchs picta*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.

Citocininas (μ M)	Número médio de PLBs por explante						Média
	B1	B2	M1	M2	A1	A2	
Controle	1,6 d A	1,0 c A	-	-	-	-	0,4
BAP 2,5	5,4 cd A	2,2 bcAB	-	-	-	-	1,3
BAP 5	9,4bc A	3,1 abc B	-	-	-	1,0 b BC	2,2
BAP 10	7,7bc A	6,0 ab A	-	-	-	1,0 b B	2,4
TDZ 3	10,5 bc A	2,4 abc B	-	-	-	1,0 b B	2,3
TDZ 6	14,7 ab A	3,0 abc B	-	5,0 a BC	-	2,8 ab BC	4,2
TDZ 9	23,1 a A	6,2 a B	1,0 a C	2,0 a C	2,0 a C	9,3 a B	7,3
Média	10,3	3,4	0,1	1,0	0,3	2,2	

Letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

TCLT da folha - B1-B2- região basal, M1-M2 – região mediana e A1-A2 – região apical.

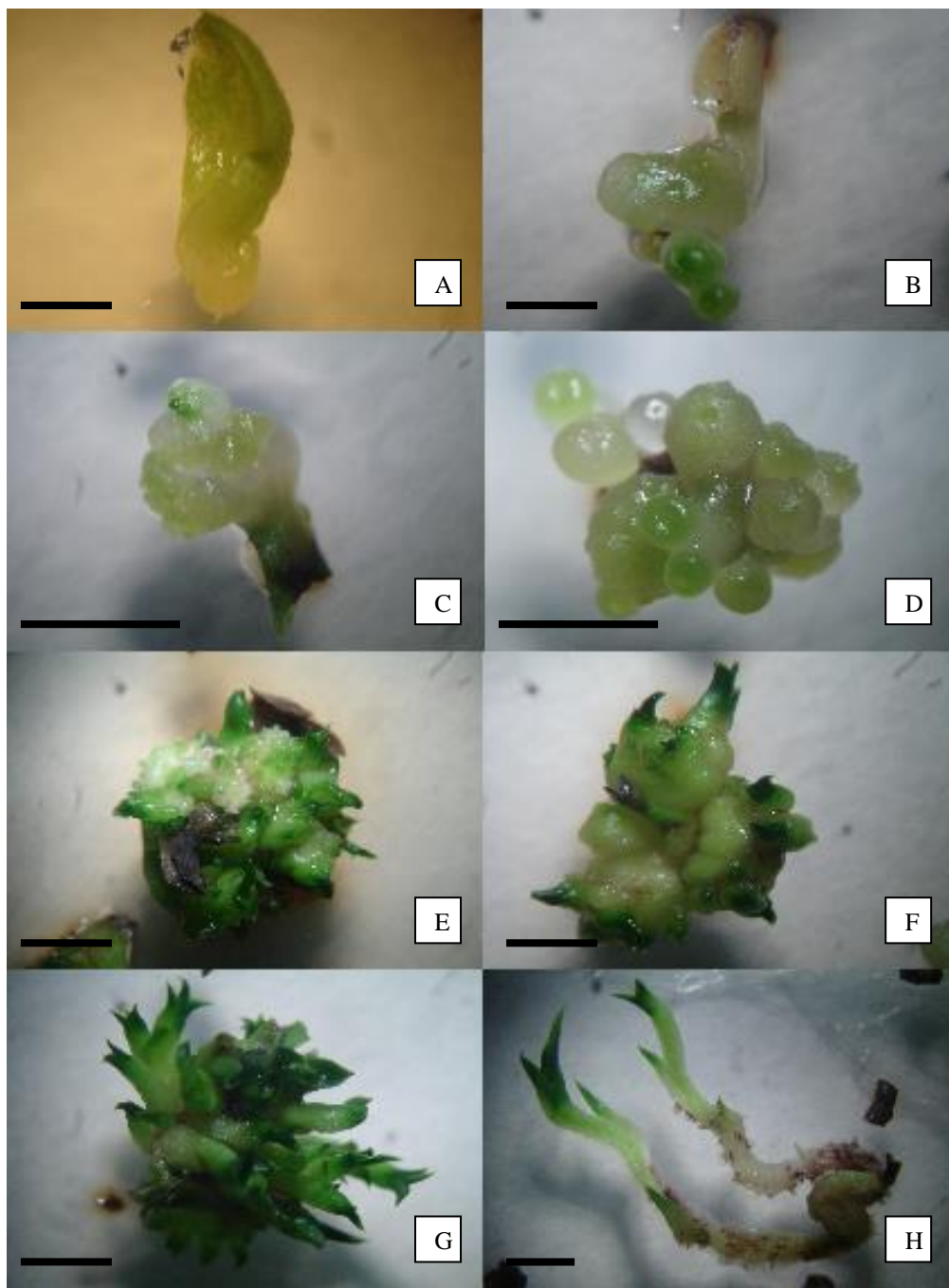


FIGURA 5- PLBs REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Brasiliorchis picta* A- FOLHA INTEIRA, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2; B- SECÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2; C- SECÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 3 μ M DE TDZ; D- SECÇÃO B1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 9 μ M DE TDZ; E- SECÇÃO A2, APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 10 μ M DE BAP; F- SECÇÃO B2, APÓS 60 DIAS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 9 μ M DE TDZ; G- SECÇÃO B2 APÓS 75 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 μ M DE TDZ; H- SECÇÃO B1 APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 10 μ M DE BAP. BARRA= 1000 μ m.

3.3 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBs A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Mormolyca rufescens*

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a porcentagem de explantes regenerando PLBs e para o número médio de PLBs por explante ($p \geq 0,05$) (ANEXO 4).

As avaliações dos explantes que regeneraram PLBs indicaram que os melhores resultados foram obtidos com a utilização de TDZ, e com a concentração mais elevada de BAP (10 μM) (TABELA 4).

O número médio de PLBs foi maior em meio de cultura com 5 μM de BAP e a medida que aumentou a concentração de TDZ ocorreu menos resposta (TABELA 4).

Para *M. rufescens* também observou-se que a base da folha foi o local que apresentou maior regeneração e ao longo da folha, em menor quantidade (FIGURA 6).

TABELA 4- EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTE DE FOLHA DE *Mormolyca rufescens*, CULTIVADA EM MEIO MS/2, ACRESCIDO DE CITOCININAS, APÓS 90 DIAS.

Citocininas (μM)	Explantes regenerando PLBs (%)	Número médio de PLBs
Controle	33,3	1,5
BAP 2,5	23,3	5,0
BAP 5	23,3	7,2
BAP 10	40,0	2,6
TDZ 3	46,7	4,4
TDZ 6	40,0	3,8
TDZ 9	53,0	2,3
Média	37,1	3,8

NS- Não significativo pelo teste F da análise de variância.

3.4 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DIRETA DE PLBs A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Mormolyca rufescens* UTILIZANDO A TÉCNICA “THIN CELL LAYER” (TCL)

A interação entre regulador vegetal e região da folha não foi significativa ($p \geq 0,05$) para a porcentagem de explantes regenerando PLBs, o que demonstra que os fatores não são independentes (ANEXO 5). Os melhores resultados de regeneração de PLBs foram obtidos nos TCLs da secção B1, sendo significativamente superiores aos das demais regiões. As regiões medianas que menos responderam (TABELA 5) (FIGURA 6).

Em relação às citocininas, a melhor resposta foi observada no meio de cultura com TDZ, com as concentrações de 6 e 9 μM , mas que não diferiram significativamente das demais concentrações de BAP e TDZ (TABELA 5).

TABELA 5- AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DOS EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs A PARTIR DE TCLTS DE EXPLANTES FOLIARES DE *Mormolyca rufescens*. CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.

Citocininas (μM)	Explantes que regeneraram PLBs (%)						Média
	B1	B2	M1	M2	A1	A2	
Controle	33,3	6,7	3,3	-	3,3	10,0	9,4 B
BAP 2,5	50,0	6,7	3,3	3,3	6,7	10,0	13,3 AB
BAP 5	33,3	10,0	3,3	3,3	3,3	10,0	10,6 AB
BAP 10	43,3	15,0	-	3,3	3,33	13,3	13,1 AB
TDZ 3	50,0	13,3	6,7	3,3	-	6,7	13,3 AB
TDZ 6	56,7	16,7	10,0	13,3	13,3	33,3	23,9 A
TDZ 9	46,7	16,7	16,7	6,7	13,3	36,7	22,7 A
Média	44,7 a	12,1 bc	6,2 c	4,7 c	6,2 c	17,1 b	

Letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey, ($p \geq 0,05$).

TCLt da folha - B1-B2- região basal, M1-M2 – região mediana e A1-A2 – região apical.

A análise estatística do número médio de PLBs revelou que não houve interação entre citocininas e regiões da folha ($p \geq 0,05$) (ANEXO 6).

O número médio de PLBs por explante dos TCLts da região mediana M2 e apical A2 foi inferior aos das demais regiões, não diferindo da região B2 e a melhor resposta foi observada nas seções B1, B2, M1 e A1 (TABELA 6)

(FIGURA 6). As melhores respostas ocorreram com a concentração mais elevada de TDZ (9 μM), sendo significativamente superiores às demais, com exceção do número obtido com a concentração de 6 μM (TABELA 6).

TABELA 6- NÚMERO MÉDIO DE PLBS REGENERADOS POR EXPLANTE A PARTIR DE TCLTS DE DIFERENTES REGIÕES DAS FOLHAS DE *Mormolyca rufescens*. CULTIVADOS EM MEIO MS/2, CONTENDO BAP OU TDZ, APÓS 90 DIAS.

Citocininas (μM)	Número médio de PLBs por explante						Média
	B1	B2	M1	M2	A1	A2	
Controle	2,3	2,0	5,0	-	3,0	3,0	2,6 BC
BAP 2,5	3,7	3,5	1,0	1,0	3,5	2,0	2,4 BC
BAP 5	3,2	1,0	10,0	2,0	4,0	2,0	3,7 B
BAP 10	3,0	2,0	-	7,0	1,0	2,7	2,6 BC
TDZ 3	3,3	1,0	3,5	2,0	-	2,0	2,0 C
TDZ 6	3,7	4,7	2,3	3,8	6,0	2,9	3,9 AB
TDZ 9	4,6	5,3	2,9	1,5	6,7	3,9	4,2 A
Média	3,4 a	2,8 ab	3,5 a	2,5 b	3,4 a	2,6 b	

Letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey, ($p \geq 0,05$).

TCLT da folha - B1-B2- região basal, M1-M2 – região mediana e A1-A2 – região apical.

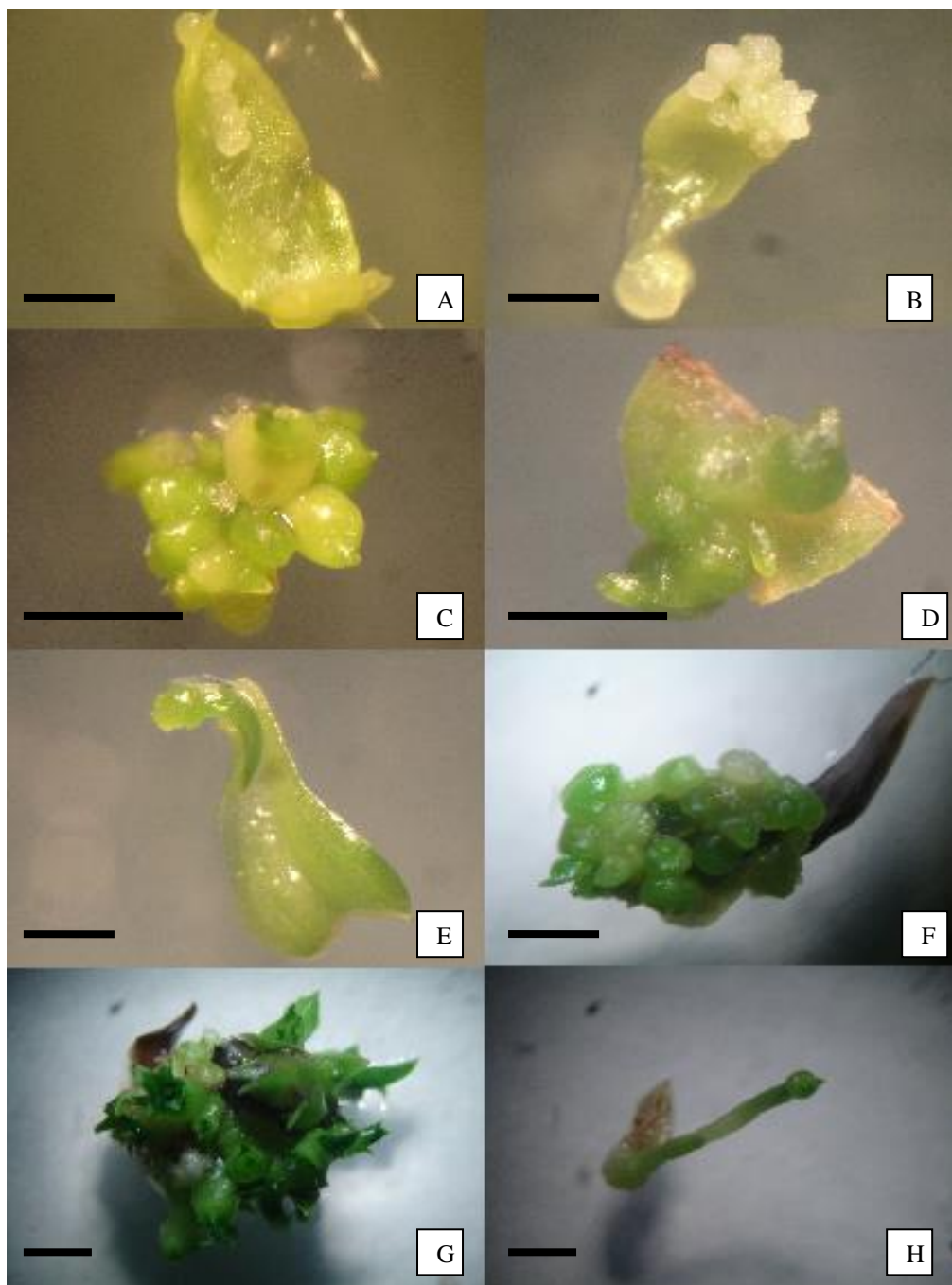


FIGURA 6- PLBs REGENERADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Mormolyca rufescens* A- FOLHA INTEIRA, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5 μM DE BAP; B- SECÇÃO B1, APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2; C- SECÇÃO B2 APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMETADO COM 2,5 μM DE BAP; D- SECÇÃO A2 APÓS 45 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMETADO COM 6 μM DE TDZ; E- SECÇÃO B1 APÓS 60 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 3 μM DE TDZ; F- SECÇÃO A1, APÓS 30 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 μM DE TDZ; G- SECÇÃO A2, APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 9 μM DE TDZ; H- FOLHA INTEIRA APÓS 90 DIAS EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5 μM DE BAP. BARRA= 1000 μm .

4 DISCUSSÃO

As folhas inteiras de *B. picta* apresentaram melhores respostas de regeneração de PLBs quando comparadas com as de *M. rufescens*. O melhor resultado de *B. picta* ocorreu com 5 μ M de BAP (70 % de regeneração de PLBs e 13,2 PLBs por explante). Entretanto, a melhor resposta de folhas de *M. rufescens* ocorreu em meio suplementado com 9 μ M de TDZ (53% de regeneração de PLBs e 2,3 PLBs por explante). Essa diferença de resposta das duas espécies pode ter sido devido às folhas de *B. picta* serem mais jovens do que as de *M. rufescens*, apesar de apresentarem o mesmo comprimento (1 cm). Segundo Kaur e Bhutani (2009) dois fatores foram fundamentais para regeneração *in vitro* de explantes foliares de *Vanda testacea*: o estado fisiológico dos tecidos (juvenildade) e o estímulo químico. Explantes foliares de mais de 1,0 cm de comprimento (considerados mais velhos) se mantiveram recalcitrantes à regeneração e os com menos de 1,0 cm (mais jovens) responderam aos reguladores. Para *Vanda testacea*, a melhor resposta de regeneração de PLBs foi inferior à das espécies estudadas no presente trabalho, quando os explantes foliares foram cultivados em meio Mitra, contendo 4,4 μ M de BAP (48,75% de regeneração) (Kaur, Bhutani, 2010).

Nas folhas inteiras de *B. picta* e *M. rufescens* observou-se o início da formação de PLBs e maior freqüência na região basal que também foi a mais responsiva nos TCLts. Resultado semelhante foi obtido por Mathews e Rao (1985), onde a principal região de resposta da folha de um híbrido de *Vanda* foi a região basal. A região mediana não respondeu e a apical com pouca freqüência de regeneração de PLBs, como foi constatado no presente trabalho. Kaur e Buthani (2009) também constataram que só os segmentos basais de folhas de *Vanda testacea* responderam ao cultivo. Segundo os autores, existe a probabilidade de vários fatores estimularem o controle meristemático dos tecidos das bases das folhas. Gantait e Sinniah (2012) explicaram que o alto potencial regenerativo de indução direta de PLBs em segmentos foliares do híbrido de *Aranda x Vanda coerulea* pode ser atribuído a resposta de ferimento

da superfície cortada das folhas, ativando células quiescentes a se tornarem ativas, iniciando a multiplicação celular.

Para as duas espécies estudadas e para os dois tipos de explantes avaliados (folhas ou TCLTs), constatou-se que é necessário a adição de uma citocinina no meio. Kaur e Buthani (2010) também indicaram que a resposta de regeneração dos explantes foliares de *Vanda testacea* foi dependente do uso de reguladores vegetais no meio de cultura. Nayak *et al.* (1997) compararam três citocininas, TDZ, BAP e cinetina (CIN) em explantes foliares de *Acampe praemorsa*, sendo o TDZ mais eficiente, na concentração de 4,4 μM , inferior à que proporcionou melhores respostas no presente trabalho.

A indução e regeneração de PLBs em folhas e em TCLTs de *M. rufescens* e em TCLTs de *B. picta* foram melhores em meio de cultura acrescido de TDZ (9 μM). O TDZ é uma citocinina mais potente para indução de organogênese em orquídeas. Esse composto tem se mostrado mais eficiente do que as citocininas purinas (BAP ou CIN) e exerce um papel importante na indução de PLBs, mesmo em concentrações muito baixas (Hutteman e Preece, 1993). O alto potencial do TDZ na indução de PLBs também foi relatado para secções basais de explantes foliares de *Renanthera* (Wu *et al.*, 2012) e em segmentos foliares de *Phalaenopsis belina* (Khoddamzadeh *et al.*, 2011). Mayer *et al.* (2010) também obtiveram a melhor resposta com TDZ (80% de regeneração de PLBs), em meio MS/2, acrescido de 1,5 μM utilizando ápices foliares de *Oncidium flexuosum*. No presente trabalho, a regeneração de PLBs das secções apicais de *B. picta* e *M. rufescens* foi bem inferior (20 e 30% respectivamente) em meio MS/2, acrescido de concentração mais elevada de TDZ.

Os explantes foliares cultivados em meios de cultura MS/2, acrescidos de BAP (2,5 a 10 μM) apresentaram menores respostas de regeneração de PLBs. Somente as folhas inteiras de *B. picta* devem ser cultivadas em meio acrescido de 10 μM de BAP. Resultado semelhante foi encontrado por Martin e Madassery (2006) que verificaram que as concentrações de BAP de até 31,1 μM não foram eficazes para induzir a formação de brotações em folhas de *Dendrobium*. Porém para plantas como *Dendrobium nobile*, *Phalaenopsis sp.*, *Cymbidium aloifolium* utilizando concentrações mais elevadas de BAP foram

eficazes na regeneração de PLBs a partir de explantes foliares (Nayak *et al.*, 2002; Kuo, Chen e Chang, 2005).

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com esse trabalho que a técnica da TCL pode ser utilizada com sucesso para a propagação clonal de plantas de *B. picta* e *M. rufescens*.

A regeneração direta de PLBs ocorre em folhas inteiras juvenis e em TCLts e a região basal da folha é a mais responsiva .

As citocininas são necessárias para indução e regeneração de PLBs utilizando explantes foliares, recomendando-se o uso do tidiazuron (9 μ M).

REFERENCIAS

ARDITTI, J. *Micropropagation of orchids*. 2nd Edition. Blackwell Publishing Ltd, v.1, 2008.

ARDITTI J.; ERNST R. *Micropropagation of orchids*. New York: J. Wiley. 1993.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N. Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* Gower Ramsay. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.69, p.41-44, 2002.

CHUNG, S.; GUHA, S.; USHA RAO, I. Micropropagation of Orchis: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, v.122, p.507-520, 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. v.1. Dordrecht:Springer, 2008. p. 46.

GANTAIT, S.; SINNIAH, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (*Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue' x *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments. *Plant Growth Regulation*, v. 68, n. 2, p. 129-140, 2012.

HUTTEMAN, C. A.; PREECE, E. J. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, v. 33, p. 105–119, 1993.

KAUR, S.; BHUTANI, K. K. *In vitro* propagation of *Vanda testacea* (Lindl.) Reichb. f.—a rare orchid of high medicinal value. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2010.

KERBAUY, G. B. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*: efeitos e fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. *Revista Brasileira de Botânica*, v.16, p.1-8. 1993.

KHODDAMZADEH, A.A.; SINNIAH, U. R.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; MAHMOOD, M.; SREERAMANAN, S. *In vitro* induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *Plant Growth Regulation*, v. 65, p.381-387, 2011.

KUO, H. L.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 41, n. 4, p. 453-456, 2005.

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

MATHEWS, V. H.; RAO, P. S. *In vitro* culture of *Vanda* hybrid (*Vanda TMA* x *Vanda Miss Joaquim*) II Studies on seedling explants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, India. Section A. Physical Sciences*, p. 496-504, 1985.

MAYER, J. L. S.; STANCATO, G. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Direct regeration of protocorm-like bodie (PLB's) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 103, p. 411-416, 2010.

NAYAK, N. R.; PATNAIK, S.; RATH, S. P. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*, v. 16, n. 8, p. 583-586, 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.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLB's) using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, v. 63, p.67-72, 2000.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis hybrid* using thin-section culture. *Plant Cell Reports*, v.21, p.46-51, 2002.

SINGH, F. Micropropagation of Orchids – *Spathoglottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 20. High-tech and micropropagation IV. Berlin: Springer, p. 223-245. 1992.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Thin cell layers: power-tool for organogenesis of floricultural crops. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. New York:Human Press 2010.

WU, K.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; CHEN, Z., ZHANG, J., YANG, Y.; DUAN, J. Efficient regeneration of *Renanthera* Tom Thumb 'Qilin' from leaf explants. *Scientia Horticulturae*, v. 135, p. 194-201, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES EM FOLHAS INTEIRAS DE *Brasiliorchis picta* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 90 DIAS. VALORES DE NÚMERO MÉDIO TRANSFORMADOS POR $\sqrt{x+0,5}$ E PORCENTAGEM POR $\log DE x+0,5$.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%):
Porcentagem de explantes com PLBs	Citocininas	6	0,9162	>0,05	14,82
Número médio de PLBs por explantes		6	2,5824	>0,05	31,88

ANEXO 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE *Brasiliorchis picta* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS. VALORES TRANSFORMADOS POR $\log DE x+0,5$.

Fonte de variação	GL	F	P
Concentração de citocininas	6	11,0218	<0,05
Região da folha	5	157,9164	<0,05
Interação	30	1,8293	<0,05

CV(%): 42,85

ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NUMERO MÉDIO DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE *Brasiliorchis picta* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS. VALORES DE NÚMERO MÉDIO TRANSFORMADOS POR $\sqrt{x+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Concentração de citocininas	6	14,5201	<0,05
Região da folha	6	84,0578	<0,05
Interação	30	2,9543	<0,05

CV(%): 32,63

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM PLBs E NÚMERO MÉDIO DE PLBs POR EXPLANTES EM FOLHAS INTEIRAS DE *Mormolyca rufescens* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO, APÓS 90 DIAS. VALORES DE NÚMERO MÉDIO TRANSFORMADOS POR $\sqrt{x+0,5}$ E PORCENTAGEM POR $\log DE x+0,5$.

Variável	Fonte de variação	GL	F	P	CV (%):
Porcentagem de explantes com PLBs	Citocininas	6	1,1691	>0,05	29,49
Número médio de PLBs por explantes		6	0,7133	>0,05	33,36

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE *Mormolyca rufescens* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS. VALORES TRANSFORMADOS POR $\log DE x+0,5$.

Fonte de variação	GL	F	P
Concentração de citocininas	6	3,9976	<0,05
Região da folha	5	11,7851	<0,05
Interação	30	0,5354	>0,05

CV(%): 101,15

ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NUMERO MÉDIO DE EXPLANTES RESPONSIVOS EM TCL DE FOLHAS DE *Mormolyca rufescens* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCININA NO MEIO DE CULTIVO E DA REGIÃO DA FOLHA, APÓS 90 DIAS. VALORES TRANSFORMADOS POR $\sqrt{x+0,5}$.

Fonte de variação	GL	F	P
Concentração de citocininas	6	4,9660	<0,05
Região da folha	5	4,2412	<0,05
Interação	30	0,9516	>0,05

CV(%): 43,24

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a formação dos tubos polínicos regulares e cápsulas, observa-se que a polinização cruzada comporta-se como via de regra e com este método é possível à obtenção de sementes viáveis para a propagação das espécies. Para tanto, os bancos de sementes se apresentam de forma alternativa e eficiente para manter a viabilidade das mesmas, visto que aos 12 meses ainda foi possível realizar experimentos com sementes armazenadas -20°C com pouca perda de viabilidade. Este resultado foi observado tanto pelo teste do tetrazólio como para a germinação *in vitro*.

Para a germinação das sementes observou-se que o melhor meio de cultura foi o WPM, pois neste meio as plântulas se mantiveram vigorosas. Em meio MS também observou-se bons resultados com a diferença de que com o passar do tempo alguns protocormos necrosaram antes de formar as plântulas.

A técnica da TCLt é promissora para a propagação massal de mudas de *B. picta* e *M. rufescens*. Os resultados indicaram que a região basal da folha foi a mais responsiva, seguida pela região apical e na região mediana quase não se observou indução e regeneração de brotos. Também foi constatado que os melhores resultados foram obtidos com TDZ em concentrações mais elevadas (6 e 9 µM).

Para o transplântio e aclimatização de mudas, o ideal seria a retirada das plântulas com duas ou mais folhas longas e raízes bem desenvolvidas. O melhor substrato para o transplântio de *B. picta* foi vermiculita.

Este trabalho demonstrou que as técnicas de germinação *in vitro* e micropropagação são eficientes para a conservação destas espécies.