

GIZELLA MACHADO VENTURA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS DO GRUPO *CATTLEYA*

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para a obtenção do
título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V468p
2002
Ventura, Gizella Machado, 1974-
Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya* /
Gizella Machado Ventura. – Viçosa : UFV, 2002.
147p. : il.

Orientador: José Maria Moreira Dias
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. Orquídeas - Propagação *in vitro*. 2. Orquídeas - Mor-
fogênese. 3. Orquídeas - Organogênese. 4. Tecidos vege-
tais - Cultura e meios de cultura. 5. *Cattleya*. I. Universida-
de Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.93415

CDD 20.ed. 635.93415

GIZELLA MACHADO VENTURA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS DO GRUPO *CATTLEYA*

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para a obtenção do
título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 22 de março de 2002.

Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Cecon
(Conselheiro)

Prof. Sílvio Teixeira Lopes

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. José Maria Moreira Dias
(Orientador)

Dedico à minha mãe, Virgília,
ao meu pai, Daniel,
às minhas irmãs e familiares,
ao Reginaldo Mafia e família.

Agradecimento

A Deus, que permitiu todas as pequenas e grandes ações.

À minha família de lá, Machado, Garcia e Ventura, que sempre esteve presente, mesmo com a distância. Obrigada pelo amor e pela torcida.

À minha família de cá, Mafia, que sempre me apoiou e me deu força para prosseguir.

Aos meus amigos, que acreditaram em mim, torceram e muito me ajudaram, principalmente Renata, Paulo, Virginia, Gustavo, Delcio e Raquel.

Ao pessoal do laboratório, em todos os momentos, especialmente, Márcio e Cinira.

Aos professores conselheiros, Novais, Sérgio, Sílvio, Wagner, Cecon, Zé Antônio e Casali, pelas preciosas sugestões.

Ao meu orientador, conselheiro e amigo, José Maria Moreira Dias e sua família, que esteve sempre ao meu lado orientando e se desdobrando, auxiliando-me nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitotecnia, ao Setor de Fruticultura e à FAPEMIG.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a preparação e conclusão desta tese.

Especial agradecimento ao meu namorado, Reginaldo, que muito me ajudou, apoiou moralmente, acreditou em mim, suportou o meu estresse de tese e continuou ao meu lado, tanto nos bons como nos difíceis momentos destes sete anos de Viçosa.

“Se hoje sou grande, porque me apoiei em ombros de gigantes...”

Biografia

GIZELLA MACHADO VENTURA, filha de Daniel Ventura Netto e Virgília Machado Ventura, nasceu em 15 de junho de 1974, em Belo Horizonte.

Em janeiro de 2000, graduou-se Engenheira-Agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Iniciou, em março de 2000, o Curso de Mestrado em Fitotecnia, na área de Propagação Vegetal e Cultura de Tecidos e Células Vegetais, na mesma Instituição, concluindo-o em março de 2002.

Conteúdo

Lista de abreviaturas	vii
Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	1
1. Descrição, origem e distribuição geográfica das orquídeas	1
2. Importância econômica das orquídeas	4
3. Problemas da cultura de orquídeas	6
4. Aplicação das técnicas de cultivo de células e tecidos <i>in vitro</i> para orquídeas	8
Revisão de Literatura	16
1. Genótipo	17
2. Idade fisiológica	18
3. Órgão do qual procede o explante	19
4. Posição do órgão na qual se extrai o explante	20
5. Métodos de desinfestação	20
6. Meios de cultivo	23
7. Condições de incubação	27
Apêndice	28
Objetivos	37
Capítulo 1. Ensaios	39
Ensaio 1. Morfogênese <i>in vitro</i> em explantes de plântulas juvenis provenientes de sementes de <i>Brassocattleya</i> Daffodil x <i>Sophrolaeliocattleya</i> Hazel Boyd ‘Sunset’	40
Resumo	41
Introdução	42
Material e métodos	44
Resultados e discussão	48
Conclusão	51
Ensaio 2. Sucessivos recultivos e subcultivos <i>in vitro</i> de calos de <i>Laelia anceps</i> alba	52
Resumo	53
Introdução	54
Material e métodos	56
Resultados e discussão	63
Conclusão	67

Ensaio 3. Organogênese <i>in vitro</i> a partir de gemas axilares de plantas adultas de <i>Cattleya loddigesii</i> x LC. Drumbeat ‘San Gabriel’ e de <i>Cattleya White Dream</i>	68
Resumo	69
Introdução	70
Material e métodos	72
Resultados e discussão	77
Conclusão	83
 Capítulo 2. Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de gemas axilares de plântulas juvenis provenientes de sementes de <i>Brassaeliocattleya</i> Sun King ‘Orange’ x <i>Laelia purpurata</i>	84
Resumo	85
Introdução	86
Material e métodos	88
Resultados e discussão	93
Conclusão	106
 Capítulo 3. Organogênese <i>in vitro</i> a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de <i>Laelia lobata</i> ‘Jenni’ x <i>L. lobata alba</i> ..	107
Resumo	108
Introdução	109
Material e métodos	111
Resultados e discussão	119
Conclusão	129
 Capítulo 4. Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de pedúnculos de inflorescências de <i>Cattleya White Dream</i>	131
Resumo	132
Introdução	133
Material e métodos	135
Resultados e discussão	138
Conclusão	140
 Referências bibliográficas	141

Lista de abreviaturas

AIA: ácido indolacético

ANA: ácido naftalenoacético

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BAP: 6-benzilaminopurina

MS: meio de cultivo com minerais nutrientes de Murashige & Skoog, 1962

KC: meio de cultivo com minerais nutrientes de Knudson C, 1946

Resumo

VENTURA, Gizella Machado; M.S.; Universidade Federal de Viçosa; março de 2002; **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***; Orientador: José Maria Moreira Dias; Conselheiros: Roberto Ferreira de Novais, Sérgio Yoshimitsu Motoike e Paulo Roberto Cecon.

Algumas espécies da família Orchidaceae, como as do gênero *Cattleya*, possuem elevada importância econômica no mercado florístico, que está em plena expansão. Isto demonstra a necessidade de se disporem de métodos adequados de propagação massal, como a cultura de tecidos. Os objetivos deste trabalho foram verificar a capacidade morfogênica de algumas espécies de orquídeas do grupo *Cattleya*, em grande medida, a formação de novas plantas a partir de explantes específicos, cultivados em diferentes meios de cultivo. No primeiro capítulo, foram descritos os ensaios que subsidiaram os experimentos desta pesquisa. Foram utilizados vários tipos de explante, como ápices radiculares de plântulas obtidas pela via seminífera *in vitro*, calos originados de protocormóides, formados *in vitro*, em temperatura elevada, e gemas axilares dianteiras de brotações de plantas adultas de distintas espécies, cultivadas em distintos meios, objetivando verificar as respostas morfogênicas dos citados explantes, bem como formulações e composição dos meios, condições de cultivo e métodos de desinfestação adequados para a condução dos experimentos. No segundo capítulo, foram utilizados segmentos de plântulas obtidas pela via seminífera *in vitro* de *Brassolaeliocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia purpurata*, cultivados em meios com concentrações variadas de auxina e citocinina, para estabelecer um meio com adequado balanço hormonal. Concluiu-se que para o híbrido utilizado, pode-se recomendar o cultivo em 47 dias, em um meio de cultivo líquido constituído de minerais nutrientes de MS, adicionando 1,24 mg L⁻¹ de BAP e 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D. No terceiro capítulo, foram usados ápices caulinares de brotações e gemas axilares, extraídos de brotações e da base dos pseudobulbos de plantas adultas, objetivando identificar o melhor explante para *Laelia lobata* 'Jenni' x *L.*

lobata alba. Embora os três tipos de explantes apresentassem alta porcentagem de oxidação, todos mostraram boa capacidade morfogênica, principalmente as gemas axilares de brotações, potencializando uma via promissora para propagação em escala comercial dessa espécie. No quarto capítulo, utilizou-se pedúnculo de inflorescência de *Cattleya* White Dream, cujas novas estruturas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de plântulas. Para esse híbrido, discos de pedúnculos de inflorescências não apresentaram respostas morfogênicas, segundo os procedimentos experimentais adotados. Uma vez que para cada espécie ou híbrido foi necessário um protocolo específico para sua propagação *in vitro*, obtiveram-se, de modo geral, respostas morfogênicas de algumas espécies, formando plântulas completas e, em alguns casos, em grande número. Dada a importância dos cultivos celulares para esta planta, estudos futuros devem ser conduzidos para se testarem outros tipos de explante, outros meios e condições de cultivo, de modo a otimizar o processo de propagação massal.

Abstract

VENTURA, Gizella Machado; M.S.; Universidade Federal de Viçosa; march 2002; ***In vitro* propagation of orchids of the *Cattleya* group**; Adviser: José Maria Moreira Dias; Committee members: Roberto Ferreira de Novais, Sérgio Motoyke and Paulo Roberto Cecon.

Some species of the Orchidaceae family, such as those from the *Cattleya*, have high economic importance in the flower market, which is in clear expansion. This shows the necessity of adequate methods for mass propagation, like tissue culture. The goals of this work are to verify the morphogenic capacity of some orchid species of the *Cattleya* group, for a great measure, the formation of new plants from specific explants, grown in different culture media. In the first chapter we describe the essays that subsidized the experiments in this thesis. Various kinds of explants were used, such as root tips from seedlings obtained through *in vitro* seed propagation, callus originated from protocorm-like bodies, formed *in vitro* under high temperatures, and forward axillary buds from young shoots of adult plants from different species, grown in different media, aiming to verify the morphogenic response of the aforementioned explants, as well as the formulation and composition of the media, growing conditions and adequate de-infestation methods for the execution of the experiments. In the second chapter, segments of seedling obtained through *in vitro* seed propagation of *Brassolaeliocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia purpurata*, grown in media with different concentrations of auxin and cytokinin, were used to establish a medium with adequate hormonal balance. We concluded that for the hybrid used we can recommend the cultivation in 47 days, in a liquid growing medium composed of MS nutritive minerals, adding 1.24 mg L⁻¹ of BAP and 0.6 mg L⁻¹ of 2,4-D. In the third chapter, young shoot tips and axillary buds, extracted from young shoots and from the basis of adult plant pseudobulbs, were used to identify the best explants for *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata alba*. Although the three kinds of explants showed high percentage of oxidation, all exhibited good morphogenic

capacity, specially the young shoot tips, indicating a promising solution for the propagation of that species in commercial scale. In the fourth chapter, we used inflorescence peduncles of *Cattleya* White Dream, whose formation of new structures could be used for the growing of seedlings. For that hybrid, sections of inflorescence peduncles did not exhibit morphogenic responses according to the experimental proceedings adopted. Considering that for each species or hybrid a specific protocol was necessary for its *in vitro* propagation, we achieved, in general, morphogenic responses from some species, forming complete seedlings and, in some cases, in large numbers. Given the importance of cellular cultivation for that plant, future studies must be conducted to test other kinds of explants, other media and growing conditions, in order to optimize the process of mass propagation.

Introdução

1. Descrição, origem e distribuição geográfica das orquídeas

Graças à beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental e medicinal, de grande interesse econômico e botânico. Taxonomicamente, as orquídeas são um único grupo de plantas agrupadas por suas características florais na família Orchidaceae (Sheehan, 1992). Esta é considerada a maior e mais diversificada família entre as plantas fanerógamas (Yew & Hew, 2000). Embora ainda não se conheça o número exato, estima-se que existam aproximadamente 20.000 espécies, contemplando ao redor de 1.000 gêneros, correspondendo a um sétimo de todas as plantas com flores (Black, 1973). Citações mais otimistas elevam esse número para 30.000 (Cronquist, 1981). Atualmente, considera-se que o número de espécies esteja entre 17.000 e 35.000 (Dressler, 1993).

Esse vasto e diversificado número de espécies de orquídeas está distribuído geograficamente por todas as partes do globo, à exceção da Antártica. Estas plantas podem ser encontradas em locais de altitudes elevadas, em florestas tropicais, tundras semiárticas, regiões desérticas, pântanos ou pradarias de gramíneas (Black, 1973).

As orquídeas são monocotiledôneas, herbáceas e perenes. Quanto ao hábito de crescimento, podem ser epífitas, terrestres, rupícolas ou saprofíticas, não existindo espécies parasitas (Black, 1973). O crescimento pode ser do tipo monopodial (ereto) ou simpodial (prostrado). Descrição das características botânicas das plantas desta família é encontrada em Black (1973), Sheehan (1992) e Dressler (1993).

No Brasil, são conhecidos aproximadamente 2.350 espécies e 203 gêneros, formando um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza (Menezes, 1987). A Mata Atlântica é considerada o principal *habitat* brasileiro das orquídeas, onde se encontram espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, como *Cattleya warneri*, *Cattleya labiata* e *Laelia purpurata* (Farias & Ribeiro, 2000).

Os primeiros relatos sobre as orquídeas foram encontrados na literatura Oriental, por Confúcio, antes da Era Cristã, exaltando principalmente a fragrância da flor. Algumas espécies foram citadas em literaturas chinesa e japonesa do início da Era Cristã. Muitos outros livros foram produzidos em chinês desde aquele período até meados do século XVIII, bem como pinturas e desenhos (Black, 1973). Já no Ocidente, ainda segundo o mesmo autor, estas plantas foram mencionadas pela primeira vez por Theophrastus, a 370-285 a.C. e o interesse estava relacionado aos seus princípios medicinais. A Theophrastus deve-se o nome 'orquídea', palavra grega que significa testículo, referindo-se ao crescimento aos pares de bulbos subterrâneos de uma espécie natural do Mediterrâneo. Por volta de 100 d.C., Dioscórides, em seu livro *Matéria Médica*, especificava as funções de mais de 600 plantas na medicina, mencionando as orquídeas como úteis na promoção da fertilidade e da virilidade, pela 'teoria da evidência', usadas principalmente como bebidas afrodisíacas.

Atualmente, algumas espécies ainda são utilizadas em muitas regiões do mundo no tratamento de artrite, diarreia, dor de cabeça, febre, tosse, problemas digestivos, como anticonceptivo (*Cymbidium madildum*, Austrália), como cicatrizante de feridas e incisões (Araujo, 2002). São utilizadas ainda como óleos essenciais para afastar sentimentos negativos (Butterfly), atingir estabilidade emocional, para tratar herpes, inflamações nas articulações e aliviar sintomas de menopausa (*Phalaenopsis* spp.) (Medicinegarden, 2002). A raiz e a planta inteira da espécie *Cypripedium parviflorum* L., *C. parviflorum* var. *pubescens* e *C. acaule* são usadas pelos nativos americanos como tranqüilizante e tônico nos tratamentos de resfriado, cãibra, diabetes, histeria, inflamações, problemas menstruais e antipasmódico (Herbvideos, 2002).

Várias partes de distintas espécies de orquídeas são utilizadas também na alimentação, na forma de produtos semelhantes ao amido, bebidas ou aromatizantes (Araujo, 2002) e na produção de compostos químicos, como resinas, taninos, ácidos gálicos, glucosídeos e quinonas fenantrenos (Herbvideos, 2002).

O interesse pelas orquídeas atingiu seu auge no século XIX, devido ao número de espécies e de colecionadores, cultivadores, literatura publicada e organizações ou sociedades orquidófilas. Grandes expedições foram organizadas, por meio das quais colecionadores europeus e americanos coletaram milhares de espécies em várias partes do mundo e, na maioria das vezes, sem preocupação ecológica ou ambiental. O interesse pelo cultivo das orquídeas, sobretudo dos híbridos, ganhou novo impulso a partir da descoberta do método de germinação assimbiótica de suas sementes e da propagação de plantas *in vitro*, via cultura de ápices meristemáticos (Black, 1973).

1.1. O gênero *Cattleya*

Para o cultivo como flor de corte, *Cattleya* é o gênero mais importante, sendo considerado por Arditti & Ernst (1992) sinônimo de orquídea e, por Menezes (1987), a rainha das orquídeas, notadamente pela exuberância e tamanho de flor. Esse nome foi uma homenagem ao botânico William Cattley, cultivador e especialista em plantas desse gênero. Para Dressler (1993), as plantas desse gênero constituem um atrativo para o público e alguns cultivadores. Há de se destacar, ainda, sua classificação com ênfase no número de políneas.

Este gênero é originário das densas florestas da Bacia Amazônica e litoral do Brasil, principalmente Mata Atlântica, das bases das encostas florestadas da Costa Rica e outros países da América Central, contemplando aproximadamente 70 espécies, todas epífitas, com proeminentes pseudobulbos, cujos tamanhos variam de 10 cm a 1,3 m. As flores são geralmente grandes, com a terceira pétala transformada em labelo, quase sempre com os bordos franjados. A parte basal ligada ao resto da flor normalmente é tubular, envolvendo a coluna (Black, 1973).

O gênero *Cattleya*, em razão da estrutura de suas flores, está inter-relacionado com muitos outros: *Laelia*, *Brassavola* e *Sophranites* (Eigeldinger & Murphy, 1972), todos semelhantes em aparência e que se inter cruzam, produzindo formas mais bonitas que aquelas que seriam obtidas utilizando-se apenas um gênero para a produção de híbridos. Muitos dos híbridos

intergenéricos conservam a morfologia da *Cattleya* e somente ao se observar as partes reprodutivas das flores é que as diferenças se tornam evidentes (Black, 1973).

2. Importância econômica das orquídeas

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLO, 1998), o mercado internacional de flores e plantas ornamentais movimenta, anualmente, negócios da ordem de 100 bilhões de dólares. A comercialização mundial, em nível de produtores, movimenta valores da ordem de 16 bilhões de dólares/ano; em nível de varejo, estima-se um volume de negócios ao redor de 44 bilhões de dólares ao ano. O cultivo de flores e plantas ornamentais ocupa uma área total estimada em 190.000 hectares (Bañeras, 1997, Castro, 1998). Os principais países produtores são Holanda, Itália, Dinamarca, Espanha, Alemanha, Japão, Israel, Nova Zelândia, África do Sul, Quênia, Estados Unidos, Havaí, Costa Rica, Colômbia e Equador.

Países como Noruega, Suíça, Suécia, Dinamarca e Itália consomem mais de US\$ 100 *per capita*/ano. Na Alemanha, Austrália, Holanda, Bélgica, França, no Japão e Estados Unidos, o consumo *per capita*/ano alcança valores acima de US\$ 40, enquanto no Brasil, pelas estimativas, estas cifras não atingem US\$ 7, muito embora seja o Brasil conhecido mundialmente pelo cultivo de plantas exóticas como orquídeas e bromélias, desde o início do século passado (Kämpf, 1997).

Os Estados Unidos gastam, por ano, em torno de 15 bilhões de dólares com a importação de flores e plantas ornamentais (Walt, 2001). A Holanda é o principal importador e exportador desses produtos, sendo responsável por 59% da exportação de flores cortadas e 48% de plantas envasadas, comercializando, em 1995, 67 milhões de dólares somente em orquídeas do gênero *Cymbidium* (Castro, 1998). Outros gêneros de orquídea bastante comercializados são *Dendrobium*, *Oncidium* e *Phaleonopsis* (Bañeras, 1997). No Equador, um dos principais produtores da América do Sul, comercializam-se 3.300 tipos de orquídea (Walt, 2001).

De acordo com Castro (1998), a floricultura brasileira é uma atividade consolidada, com importância socioeconômica em vários estados, apesar de 95 a 98% da produção nacional destinarem-se ao mercado interno e, em algumas datas especiais, devido à grande demanda, ser necessária ainda a importação (Kämpf, 1997).

Apenas 2 a 5% da produção nacional se destinam-se à exportação, principalmente para a Alemanha, Holanda, Itália, EUA, Argentina, Japão e Espanha. Nos anos de 1999 e de 2001, o Brasil exportou, respectivamente, US\$13,12 e US\$22,3 milhões. Do total exportado em 1999, US\$10 milhões deveram-se a materiais propagativos, dentre eles ornamentais e flores (Kämpf, 1997, Castro, 1998).

A floricultura brasileira é representada principalmente por crisântemos, rosas, orquídeas, lisiantos, gladiólos, lírios e gerberas, para flor de corte; e em crisântemos, violetas, primulas, azaléas, gloxínias, *poinsetias*, orquídeas, samambaias, aráceas, entre outras, para vasos (Castro, 1998).

O mercado florístico brasileiro passa por profundas mudanças, procurando estabelecer metas para aumentar produtividade e qualidade do produto, de modo a atender à demanda do mercado interno e, sobretudo, às exigências do mercado externo, em ampla expansão (Ribeiro, 2000). O IBRAFLOR desenvolveu um programa de expansão das exportações brasileiras de flores - Programa Florabrazilis, propondo metas globais para os períodos 2000/03. Por meio dessas metas, a participação brasileira no mercado mundial poderá crescer de 0,34%, em 2001, para 1,2%, em 2003, exportando 80 milhões de dólares neste mesmo ano, gerando 15 mil novos postos de trabalho, contra os atuais 4 mil, aumentando o número de propriedades rurais com esta atividade, de 210 para 700 (Brito *et al.*, 2001). É importante salientar que a principal característica destes postos de trabalhos é a mão-de-obra familiar em pequenas propriedades (Castro, 1998).

Em face de todos estes aspectos ora mencionados, observa-se o grande potencial do Brasil no que se refere à gestão em agronegócio em floricultura. Nesse contexto, devido à exuberância e beleza de suas flores, as orquídeas têm grandes e reais perspectivas, uma vez que o Brasil apresenta ampla

diversidade climática e multiplicidade de variedades, somadas às inúmeras espécies raras e exóticas, encontradas apenas no território brasileiro, com destaque ao grupo das *Cattleyas* e seus híbridos, que atingem preços que variam de R\$5,00 a R\$130,00 Reais. Dependendo da idade e proximidade da época de floração (Aranda, 2002 e Watanabe, 2002), elas podem alcançar valores muito mais altos.

A literatura é escassa quanto à comercialização mundial de orquídeas, tendo somente a Holanda dados de exportação, como citado anteriormente.

Para Castro (1998), algumas tendências podem influenciar o setor de produção: aplicação de alta tecnologia, massificação da produção e aumento de espécies e variedades exploradas, o que vem ressaltar mais uma vez a importância das orquídeas, principalmente as do grupo *Cattleya*, muitas delas autóctones do Brasil, com vasta diversidade de cores e formas, proporcionando grande número de espécies ou variedades que podem ser exploradas comercialmente (Black, 1973).

3. Problemas da cultura de orquídeas

Para uma exploração lucrativa, o uso de clones livres de doença e bem adaptados são características muito desejáveis (Arditti & Ernst, 1992). O gênero *Cattleya* e seus afins, em geral, requerem calor, luminosidade e umidade em proporções diferentes daquelas requeridas por outras orquídeas comerciais. Na natureza, as espécies crescem em condições em que os períodos úmidos são seguidos de períodos secos. Assim, a administração de água deve ser criteriosa, visando a um crescimento e desenvolvimento harmônicos da planta. Água em excesso retarda o crescimento e pode causar a morte por necrose das raízes. Com a redução diurna da radiação, a necessidade de umidade decresce e as irrigações, portanto, devem tornar-se menos freqüentes, já que diminui a evaporação na superfície do substrato que encerra o sistema radicular. As espécies do gênero *Cattleya* são epífitas e, conseqüentemente, suas folhas têm um papel preponderante na absorção de nutrientes (Black, 1973).

Quanto ao clima, as temperaturas ideais são 16 °C durante o dia e 13 °C à noite, no inverno. Durante o verão, as temperaturas diurnas deverão ser de 21-24 °C e noturnas de 18 °C (Black, 1973).

As cochonilhas são as pragas mais severas para as espécies do gênero, pois, ao crescerem em condições de déficit hídrico e temperaturas elevadas, exigem para seu controle a manutenção de um teor elevado de umidade junto à planta. Outros insetos, dentre eles os afídeos, podem constituir-se, também, em grandes obstáculos para *Cattleya* (Black, 1973).

A maioria das doenças é causada por fungos, ocorrendo principalmente em períodos de elevada umidade. Os mais freqüentes são *Gloesporium macropus* Sacc., *Cladosporium orquidearum* Cke. & Masee e *Pythium* spp. (Menezes, 1987).

Os vírus de maior importância são os do mosaico do *Cymbidium* e da mancha-anelar do *Odontoglossum*. Os vírus constituem grande problema, por ineficácia dos métodos de controle. Recomenda-se, geralmente, incinerar as plantas infectadas (Ishii, 1974).

Como discutido anteriormente, as orquídeas foram inicialmente exploradas por meio de coletas indiscriminadas de uma única espécie ou de várias variedades existentes, retiradas de seus *habitats*. Esse problema tem se agravado com o crescimento urbano, com o aumento das atividades agrícolas e extrativismo predatório (Menezes, 1987, 1995), desmatamentos e incêndios (Carneiro *et al.*, 2001). Muitos indivíduos dessa família de plantas vêm sendo dizimados ou suprimidos e, segundo Carneiro *et al.* (2001), empobrecendo, de forma gradativa, a biodiversidade. Atualmente, inúmeras variedades estão em risco ou já foram extintas, provavelmente sem nem haver sido estudadas ou classificadas; restando de outras poucos exemplares, geralmente, em domínio de colecionadores e, às vezes, restrito apenas a um proprietário (Menezes, 1987, Gloeden, 1998).

Para satisfazer às necessidades de mercado, preservar as espécies, manter a biodiversidade e recuperar áreas já despovoadas, é, portanto, importante dispor de métodos adequados de propagação, de modo a permitir a

clonagem rápida e massiva destas plantas. A propagação pode ocorrer de duas formas: seminífera ou sexuada e vegetativa ou assexuada (Pierik, 1990).

As orquídeas são plantas de fecundação cruzada, com alta taxa de heterogeneidade, segundo Reinert & Mohr (1967). Portanto, a propagação por semente não é adequada quando aplicada em larga escala, por não apresentar homogeneidade da população descendente, dada à segregação genética (Pierik, 1990). Além disso, a propagação seminífera convencional mostra baixo rendimento, em face de algumas poucas sementes germinarem, por não possuírem endosperma e serem dependentes de associação simbiótica com fungos, sendo, contudo, um processo moroso (Sheehan, 1992).

A propagação vegetativa corrente tem sido a natural, por meio de divisão de touceiras, a partir de gemas dormentes de pseudobulbos ou de pequenas mudas que se formam nos rizomas e em hastes florais. Apesar de possível para alguns casos específicos e de proporcionarem uma descendência geneticamente idêntica à planta-matriz, esse método apresenta a desvantagem de ser lento e de ter baixo rendimento, além de as plantas formadas apresentarem período juvenil longo. Há que se salientar ainda que pelo método de divisão de touceira cada planta deve conter de três a quatro pseudobulbos, enfatizando que em algumas espécies, como em *Cattleya*, ocorre formação de um único pseudobulbo por ano, o que demoraria três a quatro anos para formar uma planta (Sheehan, 1992). Portanto, a utilização desse método, em escala comercial, não é recomendável (Reiner & Mhor, 1967).

4. Aplicação das técnicas de cultivo de células e tecidos *in vitro* para as orquídeas

4.1. Para estudos de anatomia vegetal

O estudo de anatomia de orquidáceas em literatura especializada é escasso, devido ao vasto número de gêneros e espécies. Os membros desta família são extremamente especializados, com grande capacidade adaptativa, ocupando diversos nichos ecológicos, razão pela qual apresentam inúmeras alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas (Martins & Widholzer, 2001).

Os processos ocorridos em cultivo *in vitro*, como formação de calos, protocormóides, embriões, gemas adventícias e raízes são excelentes sistemas para estudos anatômicos, fundamentação e compreensão da morfogênese e organogênese (Esau, 1976).

4.2. Para estudos de fisiologia vegetal

Esse tema foi cuidadosamente revisado por Arditti & Ernst (1992). De acordo com estes autores, várias estruturas e órgãos de orquídeas cultivadas *in vitro* podem ser utilizados para estudos fisiológicos. Por exemplo, protocormóides podem ser usados para estudos dos efeitos de pH inicial no crescimento de plântulas de orquídeas, como realizados por Piriyanjankul e Vajrabhaya (1980), citados por Arditti & Ernst (1992). Raízes de orquídeas são excelentes para estudos de geotropismo, fototropismo, relação luz e geotropismo, por serem ageotrópicas e, algumas vezes, negativamente geotrópicas. Raízes de plântulas de *Phalaenopsis* crescem em presença de luz, com as extremidades voltadas para cima, ao passo que as de plântulas de *Cymbidium* crescem em meio de cultivo escuro e voltadas para baixo. Podem-se ainda com as raízes das orquídeas desenvolver estudos de fotossíntese, já que elas são verdes e podem fixar carbono, como as de *Cattleya* e *Epidendrum*. As raízes de algumas espécies de orquídeas produzem antocianinas, fitoalexinas, outras fazem associações micorrízicas, de considerável interesse ecológico e desenvolvimento fisiológico. Explantes de folhas de orquídeas de metabolismo ácido crassuláceo (CAM), como dos gêneros *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Laelia* e outros, e C₃, como algumas espécies do gênero *Cymbidium* e *Oncidium*, têm sido cultivadas *in vitro* para produzir células e protocormóides, que podem ser usados em pesquisas fisiológicas. Estudos de florescimento de plântulas *in vitro* têm sido realizados com *Cymbidium* e *Oncidium*, assim como desenvolvimento e a transformação de gemas florais em vegetativas em *Phalaenopsis* e *Arachnis* Maggie Oei.

Arditti & Ernst (1992) citam ainda várias outras áreas em que as orquídeas apresentam-se como sistemas *in vitro* adequados para pesquisas: formação de embrião somático; protoplasto; formação de parede celular;

comparação entre existência de híbridos sexuais e mesma combinação obtida por meio de fusão de protoplasto; desenvolvimento; e ontogenia.

4.3. Para estudos de nutrição mineral

Os protocormóides e as plântulas de orquídeas podem ser utilizados para testar a composição ótima do meio de cultivo (Arditti & Ernst, 1992), estabelecendo as concentrações adequadas de macro e micronutrientes para cada espécie (Caldas *et al.*, 1998).

As raízes de orquídeas crescidas e desenvolvidas *in vitro* podem constituir-se em bons sistemas para pesquisas de absorção mineral e quimiotropismo (Arditti & Ernst, 1992).

4.4. Para estudos de fitopatologia e limpeza clonal

Importantes contribuições na área de fitopatologia podem ser obtidas a partir da aplicação de técnicas de cultura de tecidos, como sistemas de co-cultura de patógenos com os tecidos de plantas hospedeiras, permitindo o estudo das relações entre os dois organismos em condições controladas, levando à descoberta de mecanismos de patogenicidade e de resistência em nível celular; recuperação de plantas livres de vírus e de outros agentes causadores de enfermidades sistêmicas, proporcionando redução das perdas associadas a elas (Duval *et al.*, 1998).

A partir da descoberta da eliminação de viroses por meio do cultivo de ápices meristemáticos, esta técnica vem sendo utilizada amplamente e com êxito para vários cultivares, visando à obtenção de plantas livres de vírus, mesmo tendo como fonte plantas infectadas (Ishii, 1974).

Investigações em *Cymbidium*, realizadas por Morel (1960), citado por Pierik (1990), demonstraram que só é possível obter plantas livres de vírus quando se utilizam ápices meristemáticos com tamanho aproximado de 1 mm, com dois primórdios foliares.

Ishii (1974) estudou a eliminação de vírus em *Laeliocattleya areca* 'Titanic' duplamente infectadas (vírus-do-mosaico do *Cymbidium* e da mancha-anelar do *Odontoglossum*), utilizando o cultivo de ápice meristemático. Testou

vários tamanhos de explantes (de 0,2 a 1,5 mm), concluindo que explantes menores que 0,5 mm de comprimento não sobreviveram e aqueles entre 0,5 e 1,00 mm mostraram melhor taxa de sobrevivência, porém permaneciam infectados. Quando realizou a enxertia de pequenos explantes na extremidade de mericlones sadios de *Cattleya*, observou êxito no crescimento destes pequenos explantes, porém somente um vírus era eliminado.

Prakash *et al.*(1996), utilizando cultura de secções finas (0,6 mm) de ápice caulinar do híbrido trigenérico *Mokara* (*Arachnis* x *Ascocentrum* x *Vanda*), planta duplamente infectada com os dois vírus já citados, comprovaram ser possível eliminar ambos os vírus, com ou sem a presença de ribavirin no meio de cultivo.

4.5. Para produção de metabólitos secundários

Dörnenburg & Knorr (1996) fizeram uma revisão abalizada sobre o uso de cultura de células e tecidos de distintas espécies de plantas para a síntese e produção de metabólitos secundários com importante utilização como corantes, aromatizantes e adoçantes. Ao contrário das condições de campo, em que as plantas são submetidas a significativas flutuações ambientais e variações geográficas, em condições *in vitro* a produção qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários dá-se de forma contínua e uniforme.

Os metabólitos secundários encerram uma ampla gama de compostos orgânicos complexos, em que cada um é sintetizado por plantas de uma família específica (Collin & Edwards, 1998). Segundo estes autores, os maiores grupos são os alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides e fenóis, estando suas funções relacionadas com a defesa da planta contra ataque de fitoparasitas, sendo sintetizados também em resposta a estresses abióticos: baixas ou altas temperaturas, pressão osmótica e danos físicos.

O cultivo *in vitro* de orquídeas pode constituir-se em uma técnica adequada e eficiente para a produção de metabólitos secundários, dada a importância dos efeitos terapêuticos destas plantas na medicina, na fabricação de cosméticos e como aromatizantes (Herbvideos, 2002).

Segundo Knuth & Sahai (1991), citados por Dörnenburg & Knorr (1996), a *Vanilla fragrans* sintetiza metabólitos aromatizantes (vanilina) no meio de cultivo. Esta produção é aumentada quando se adiciona carvão ativado. A produção de vanilina, obtida em meio de cultivo, encontrada por Knuth & Sahai foi de 2,2 %, comparável a 1 a 3 % contida em vagens maduras desta espécie.

Westcoott *et al.* (1994) desenvolveram um processo para produção de vanilina natural, utilizando tecidos radiculares de *V. planifolia*. Estes se mostraram centros biocatalíticos ativos na transformação de ácido ferúlico em vanilina na presença de carvão ativo. Obtiveram produtividade de 400 mg por quilograma de tecido por dia, correspondendo a 40 % da concentração encontrada em vagens de vanila, alcançando um produto final com uma proporção de p-hidroxibenzaldeído (segundo componente mais importante da vanilina) similar ao detectado naturalmente.

Alguns trabalhos foram realizados utilizando as espécies *Vanilla planifolia*, *V. fragrans* e outras espécies do gênero para estudos da influência de fitorreguladores no crescimento de células e formação de substâncias fenólicas. Os fitorreguladores possuem marcada influência na via metabólica dos fenilpropanóides, constituintes mais abundantes da vanilina, Dörnenburg & Knorr (1996). Funk & Brodelius (1990) verificaram que 2,4-D impede a síntese de vanilina nestas culturas em suspensão, mas aumenta significativamente a quantidade de fenóis totais extraíveis. Este aumento é ainda maior quando esta auxina está em combinação com cinetina, principalmente ácido cumárico e sinápico. Para estes autores, em condições normais de crescimento, a cultura de células não produz derivados de benzoato detectáveis. A presença de cinetina no meio de cultivo beneficia a síntese de ácido vanílico, precursor da vanilina.

4.6. Para o processo de criopreservação

O armazenamento de pólen e sementes de orquídeas a baixas temperaturas, por um período de 35 e 70 anos, respectivamente, é prática comum em cultivo de orquídeas. Recentemente, tem sido armazenado o calo de *Dendrobium*. Portanto, a criopreservação é uma técnica importante para se

manter a diversidade genética e os clones específicos (Arditti & Ernst, 1992). Os resultados indicaram que calos podem ser armazenados facilmente a 10 °C; porém, é necessário o desenvolvimento de mais pesquisas (Sivasubramaniam *et al.*, 1987, citados por Arditti & Ernst, 1992).

4.7. Para o processo da propagação clonal

Como discutido anteriormente, os métodos de propagação seminífera convencional e propagação vegetativa natural por divisão de touceiras têm se mostrado inadequados ou ineficientes e antieconômicos, para plantas desta família. O cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido, portanto, uma excelente alternativa a ser empregada para a propagação das orquídeas, apesar de ser um processo lento e demandar mão-de-obra especializada. Segundo Prakash *et al.* (1996), as orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas pelo método de cultivo *in vitro* em escala comercial.

O desenvolvimento do método de germinação assimbiótica de sementes *in vitro*, por Knudson em 1922, possibilitou os estudos posteriores visando à propagação vegetativa *in vitro*. Rotor (1949), Morel (1960, 1964, 1969) e Reinert & Mohr (1967) são exemplos dos primeiros pesquisadores que lograram com êxito a propagação de orquídeas (Read & Szendrak, 1998).

Os cultivos *in vitro* apresentam as vantagens de serem, em alguns casos, muito eficientes, proporcionarem altos rendimentos e manterem nos descendentes as características da planta-matriz (Pierik, 1990). Os cultivos *in vitro* apresentam ainda vantagens únicas sobre os métodos convencionais de propagação, como multiplicação rápida e obtenção de populações homogêneas de genótipos oriundos de programas de melhoramento genético. As células competentes e especializadas são manipuladas para proporcionar elevada multiplicação de plantas-matrizes, sob estímulos apropriados e ótimas condições de incubação (Govil & Gupta, 1997).

4. 8. Para o melhoramento genético e desenvolvimento de variedades

Segundo Rentoul (1981), citado por Arditti & Ernst (1992), as orquídeas podem ter sido as primeiras plantas a serem melhoradas *in vitro* por meio de poliploidização.

A cultura de células e tecidos pode contribuir, de forma decisiva, para o melhoramento genético, o aprimoramento e obtenção de novas variedades e cultivares de orquídea com características superiores, em um espaço de tempo inferior àquele demandado pelos métodos puramente clássicos (Thorpe & Harry, 1997; Ferreira *et al.*, 1998).

Espécies de orquídeas, quando submetidas ao cultivo *in vitro*, têm apresentado respostas morfogênicas satisfatórias (Arditti & Ernst, 1992).

As técnicas de cultivo *in vitro* oferecem alternativas atrativas para que sejam rompidos vários dos obstáculos do melhoramento clássico. Um dos mais importantes desses obstáculos é a impossibilidade de incorporar variabilidade para certos caracteres de interesse agrônomo, empregando métodos convencionais, devido à barreira imposta pela biologia floral de certas plantas desta família, como determinados mecanismos bioquímicos que impedem a germinação ou o crescimento de pólen da mesma planta ou clone, ocorrendo também a autopolinização, além da existência de incompatibilidade entre certas espécies (Dressler, 1993). O emprego de métodos de seleção em cultivo *in vitro*, como aplicação de tratamentos mutagênicos e variação somaclonal, para obter materiais que apresentem autocompatibilidade ou resistência a vicissitudes climáticas e a fitoparasitas, é uma alternativa promissora (Ferreira *et al.*, 1998). Assim, a poliploidização para recuperação da fertilidade de plantas estéreis, como certos triplóides, bem como a produção de orquídeas triplóides e tetraplóides com maior produtividade e qualidade de flor de corte, como *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* e *Vanda* referidos por Menezes (1987), e as mutações induzidas visando à seleção de clones melhorados, referidos por Vajrabhaya & Vajrabhaya (1974), Sahavacharin (1980), Teo (1981), citados por Arditti & Ernst (1992), poderão lograr êxito com maior facilidade.

É, porém, reduzido o número de trabalhos publicados que envolvem cultura de células e tecidos vegetais de espécies de orquidáceas. Além disso, ainda é necessário otimizar protocolos eficientes de propagação clonal em larga escala (Arditti & Ernst, 1992), para que as biotécnicas não convencionais sejam aplicáveis ao fitomelhoramento genético.

Revisão de literatura

Os cultivos *in vitro* em orquídeas ainda deparam com algumas limitações, como custo de produção, utilização de mão-de-obra especializada, otimização de protocolos de cultivo específicos para espécies, variedades ou híbridos desta planta e necessidade de aclimação prévia das plantas antes de estas serem transferidas para condições de céu aberto (Govil & Gupta, 1997).

Outros aspectos de fundamental importância são o estabelecimento de cultura asséptica e resolução de problemas relativos à exsudação fenólica pelos explantes. Portanto, é necessário o desenvolvimento de procedimentos que assegurem a plena capacidade morfogênica dos explantes, sem a qual a técnica apresenta baixo rendimento e eficiência (George, 1993).

Murashige (1974) apresentou o conceito de estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, dividindo-o em três estádios, e, em algumas ocasiões, o estágio 0 é citado, correspondendo ao tratamento dado à planta-matriz, para melhorar seus aspectos nutricionais e fisiológicos:

- Estádio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;
- Estádio II – multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação; e
- Estádio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para recipientes ou solo, para aclimação.

Cada um desses estádios tem seus próprios problemas e particularidades que variam conforme a espécie e até mesmo variedades (Debergh & Zimmerman, 1993). Ademais, para a propagação de orquídeas, em cada uma dessas etapas, a composição do meio de cultivo é geralmente modificada, tendo, portanto, um meio inicial, outro de manutenção e um terceiro de enraizamento (Leffring, 1968, citado por Pierik, 1990).

Segundo Prakash *et al.* (1996), a organogênese de orquídeas por cultura de tecidos envolve duas etapas distintas: (1) diferenciação direta de protocormóides, a partir de cultura de tecidos ou órgãos até formar plântulas (organogênese direta); e (2) diferenciação indireta dos protocormóides, a partir de explantes de tecidos por meio de uma fase intermediária de calo (organogênese indireta).

Arditti & Ernst (1992) definiram protocormóides como estruturas que se assemelham a protocormos, formados *in vitro* a partir de um tecido ou calo.

No Quadro 1a, que contém os resumos dos trabalhos revisados por Arditti & Ernst (1992), e no Quadro 1b, que mostra outros trabalhos, há informações acerca de alguns dos principais que lograram obter plantas de orquídeas do gênero *Cattleya* e outros gêneros afins, a partir de distintos explantes cultivados *in vitro*, nos últimos anos. Esses trabalhos claramente demonstram a existência de resultados extremamente conflitantes e heterogêneos.

Os dados dos trabalhos revisados revelam que o êxito do processo de organogênese, seja direto (70 % dos casos) ou indireto (15 % dos casos), de acordo com os quadros citados anteriormente, vai depender do genótipo; da idade fisiológica; do órgão do qual procede o explante; da posição do órgão do qual se extrai o explante; do método de desinfestação; do meio de cultivo; da composição hormonal; e das condições de incubação.

1. Genótipo

A resposta morfogênica de um tecido a condições *in vitro* pode variar amplamente entre gêneros, espécies, cultivares e mesmo entre plantas individuais do mesmo genótipo, crescendo em diferentes condições ambientais. Ademais, em plantas que sofrem flutuações anuais ou mesmo diárias dos fatores climáticos, parece existir ritmos endógenos fisiológicos, os quais podem ser críticos para o estabelecimento da cultura (Arditti & Ernst, 1992). Portanto, para o cultivo *in vitro*, de cada gênero, espécie, cultivar ou híbrido de orquídeas, pode requerer um método próprio e mais adequado (Govil & Gupta, 1997).

Em geral, todos os trabalhos que utilizam distintos genótipos (Quadros 1a e 1b) mostram que a resposta morfogênica é dependente deste fator. Ademais, tanto o desenvolvimento de plântulas como a capacidade de enraizamento destas (Lindemann, 1970; Morel, 1970; Huang, 1984; Prakash, 1995, 1996; Peres e Kerbauy, 1999) são dependentes da espécie.

Peres & Kerbauy (1999) estudaram a iniciação da parte aérea a partir de explantes extraídos da extremidade de raízes de *Catasetum frimbriatum* Lindl., em razão dos níveis endógenos de auxina/citocinina. Comparando-se os resultados obtidos com aquela espécie e os conseguidos com *Cattleya* e *Oncidium*, esses autores concluíram que estas últimas não são capazes de formar gemas por meio de extremidades de raízes, devido à incompetência deste órgão em atingir o balanço auxina/citocinina adequado para tal, ou, apesar de alcançar o adequado balanço de auxina/citocinina, suas novas células possuem alto grau de determinação.

Segundo Arditti & Ernst (1992), o êxito em obter e manter linhas celulares, com longa vida, igualmente vai depender do genótipo.

Outro aspecto importante é que a planta-matriz seja sadia, uma vez que o estado fisiológico do material de partida tem influência na resposta da cultura *in vitro* (Collin & Edwards, 1998).

2. Idade fisiológica

Em vários trabalhos, dos listados nos Quadros 1a e 1b: (Arditti *et al.*, 1971; Ball *et al.*, 1971; Churchill *et al.*, 1971; Vajrabhaya, 1978, Kononowicz & Janick, 1984; e Prakash *et al.*, 1996) tem sido mencionada a utilização de explantes originados de plantas adultas, em 55 % dos casos. Nos demais, foram utilizados explantes procedentes de plântulas germinadas e crescidas *in vitro* ou de plantas juvenis, cultivadas em casa de vegetação.

Independentemente de os trabalhos ensaiarem explantes adultos ou juvenis, sempre foram utilizadas como explantes partes da planta que continham tecido meristemático (Quadros 1a e 1b).

Ao se compararem os trabalhos que utilizam os dois tipos de explantes, verifica que a capacidade morfogênica do material juvenil é bem mais elevada

que a de explantes fisiologicamente mais velhos. Collin & Edwards (1998) ressaltam que explantes procedentes de tecidos mais jovens, em princípio, apresentam alta proporção de células em ativo processo de divisão e, portanto, mais responsivos ao processo morfogênico. Talvez esta seja a razão pela qual as plantas juvenis têm sido usadas como fonte de explante em aproximadamente 45 % dos casos (Quadros 1a e 1b).

A maior proporção de trabalhos ensaiando explantes provenientes de plantas adultas talvez possa ser explicada pelo fato de a flor ser o alvo principal, sendo necessária uma análise de suas características, para uma avaliação qualitativa da planta e seleção desta como matriz.

Arditti & Ernst (1992), ao trabalhar com explantes de plântulas *in vitro* e de plantas juvenis, em casa de vegetação, constataram que a primeira fonte de material é mais econômica e permite avaliar a efetividade dos distintos fatores implicados no processo de propagação.

3. Órgão do qual procede o explante

A partir dos trabalhos resumidos nos Quadros 1a e 1b, pode-se observar que tecidos ou órgãos de diferentes partes de plantas matrizes adultas ou juvenis foram utilizados como explantes, como: ápices meristemáticos e caulinares, tecidos foliares, segmentos caulinares e radiculares, partes florais, além de calos e protocormóides.

Em aproximadamente 35 % dos trabalhos revisados utilizaram-se, como explantes, ápices meristemáticos de gemas laterais ou terminais. Estes foram extraídos, em 57,1 % dos casos, de brotações com aproximadamente de 1 a 15 cm; de rizomas (28,6 % dos casos) ou de bulbos dormentes ou não (14,3 % dos casos), todos oriundos de plantas adultas.

Ainda referente aos trabalhos, 48,7 % destes utilizaram como explantes calos e protocormóides, que foram originados, em 45 % dos casos, de plântulas *in vitro*.

Champagnat *et al.* (1970), Arditti *et al.* (1971), citados por Arditti & Ernest, 1992, Churchill, 1973; Mauro *et al.*, 1994 e Prakash *et al.* (1996)

utilizaram como explantes folhas jovens, extraídas de plântulas germinadas e mantidas sob cultivo *in vitro* e de plantas adultas *ex vitro*.

Embora possam ser utilizados como explantes, os ápices de folhas jovens não mostram freqüentemente alta capacidade morfogênica. A formação de calo aparentemente depende da presença de tecido meristemático ou indiferenciado no ápice foliar. Se este tecido não estiver mais presente não haverá formação de calo. Dessa forma, é necessário obter ápices de folhas muito jovens (Arditti *et al.*, 1971).

Apenas Kerbaux (1991) e Peres & Kerbaux (1999) estudaram a iniciação da parte aérea a partir de segmentos da extremidade de raízes, extraídas a partir de plantas juvenis, resultando na formação de calos, no gênero *Cattleya* e *Oncidium*, e em plântulas, em *Catasetum fimbriatum* Lindl.

4. Posição do órgão do qual se extrai o explante

Em 1974, Ishii descreveu que explantes extraídos de extremidade apical, contendo basicamente tecidos meristemáticos, podem estar isentos de microrganismos sistêmicos, principalmente vírus, podendo-se, assim, apresentar desenvolvimento mais vigoroso, dependendo do tamanho do explante.

5. Método de desinfestação

Um método eficiente de desinfestação do explante é fundamental para assegurar cultivos axênicos em propagação *in vitro* (George, 1993). Este tema foi bem revisado em 1994 por Leifert *et al.* Para estes autores, microrganismos contaminantes das superfícies dos explantes podem ser geralmente removidos pelo tratamento com diversas substâncias biocidas como os alcóois e os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio. George & Sherrington (1984) citam ainda como desinfestantes o cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio, ácidos ou bases concentradas, mertiolate e algumas substâncias do grupo das bases quartenárias, como os triquartenários de amônio. Segundo Leifert *et al.* (1994), estes desinfestantes podem estar ou não combinados com substâncias

químicas mais seletivas, como os inseticidas, fungicidas e antibióticos e que o tempo da desinfestação, bem como a concentração destes compostos podem variar de acordo com a sensibilidade do tecido vegetal.

Segundo Pierik (1990), o etanol apresenta ação germicida e surfactante, e, aplicado inicialmente, facilita a ação dos outros produtos. Geralmente, ele é utilizado a 70 %, pois em concentrações maiores pode desidratar rapidamente os tecidos. O cloro é o princípio ativo mais utilizado, juntamente com o etanol, sendo as concentrações mais empregadas de 0,5 a 2,0 % de cloro ativo. Os cloretos de mercúrio e de benzalcônio são tóxicos, tanto para o tecido vegetal como para os humanos, sendo comumente utilizados em baixas concentrações e poucas vezes. Após a desinfestação, segundo o mesmo autor, os explantes devem ser lavados sucessivamente (geralmente três vezes) com água destilada autoclavada.

Reinert & Mohr (1967); Scully (1967); Lindemann *et al.*(1970); Kako (1973) e Vajrbhaya (1978), citados por Arditti & Ernst (1992), utilizaram para desinfestar explantes procedentes de plantas adultas de *Cattleya*, solução de cloro comercial, cuja concentração e tempo de exposição variaram entre 0,1 a 20 %, por 5 a 30 minutos, álcool 70 e 95 %, por 5 minutos, e solução de hipoclorito de cálcio (0,4 a 8,0 %), por 20 a 30 minutos, dependendo do tipo de explante utilizado em cada trabalho.

Explantes aparentemente livres externamente de microrganismos podem, entretanto, apresentar contaminação interna que se torna visível apenas depois de um período de contato com o meio de cultivo. Em alguns casos, após vários recultivos. Um crescimento lento e, ou, clorose podem ser indicativos de uma infecção interna, por exemplo, por *Erwinia carotovora*, Knauss & Miller (1978), citados por Pierik (1990).

As contaminações internas em plantas devem-se geralmente a bacilos (principalmente *Bacillus licheniformis* e, ou, *Bacillus subtilis*), os quais têm sido denominados fantasmas brancos (white ghosts) nos Estados Unidos. Estas bactérias saprofíticas caracterizam-se pela formação de esporos capazes de tolerar condições consideradas desfavoráveis, como calor, deficiência hídrica, frio, radiação ultravioleta e agentes químicos desinfestantes (Pierik, 1990).

Segundo esta mesma autora, antibióticos adicionados ao meio de cultivo não têm apresentado resultados efetivos. Geralmente, são utilizados em elevadas concentrações, que inibem o crescimento e desenvolvimento das plantas. Podendo conduzir a seleção de microrganismos resistentes.

Quanto à contaminação por vírus, não pode ser eliminada pelos métodos de desinfestação descritos anteriormente. Entretanto, sabe-se que partes muito jovens de plantas infectadas contendo células meristemáticas em ativa divisão estão livres de muitas viroses. Excisão de pequenos domos meristemáticos (0,1 a 1 mm) ou domos com 1 a 5 primórdios foliares tem sido utilizada desde a década de cinquenta para eliminar viroses de plantas. Este procedimento tem sido usado em combinação com termoterapia da planta-matriz ou durante o crescimento inicial *in vitro* e incorporação de compostos químicos no meio de cultivo que inibem a replicação viral (Leifert *et al.*, 1994).

Estes mesmos autores e também Grattapaglia & Machado (1998) relatam que os compostos ribavarin (Virazole, Viratek) e ditiouracil têm sido promissores, inclusive em orquídeas, para eliminar o vírus-do-mosaico do *Cymbidium*. Porém, deve ser observado com cuidado, pois interferem também no metabolismo celular da planta, podendo ser fitotóxico.

Atualmente, muitos laboratórios de cultura de células e tecidos vegetais têm empregado substâncias detergentes elaboradas por algumas indústrias químicas para atender a desinfestações específicas. Vale ressaltar que dada a sensibilidade dos tecidos vegetais aos desinfestantes até então utilizados, foi desenvolvido, nos Estados Unidos, o produto PPM (Plant Preservative Mixture - TM®). Este produto tem sido uma nova alternativa ao uso de antibióticos e fungicidas convencionais em cultura de tecido. É de amplo espectro de ação preventiva e biocida (George & Tripepi, 2001). As doses recomendadas variam de 0,5 a 2 mL L⁻¹, mas, para proliferação de calos, organogênese e embriogênese recomenda-se 0,5 a 0,75 mL L⁻¹. Os explantes podem ser tratados previamente com esse produto, ou este pode ser adicionado ao meio pré ou pós autoclavagem, para prevenir contaminações exógenas e endógenas (ISI, 2001).

6. Meio de cultivo

À luz do atual conhecimento, não existe, ainda, um meio específico de cultivo adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone. Em geral, é difícil explicar porque em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos, enquanto em outras não se tem logrado êxito. Apesar disso, algumas generalizações podem ser feitas.

Os meios originais formulados por vários autores têm sido, geralmente, modificados para satisfazer às necessidades individuais de certas orquidáceas ou mesmo pela preferência do pesquisador (Arditti & Ernst, 1992). Dessa forma, várias formulações têm sido utilizadas, dependendo do autor, dos tipos de explantes utilizados e das estruturas de regeneração desejadas.

Nos trabalhos revisados (Quadros 1a e 1b), verifica-se que foram utilizados os seguintes meios para o cultivo *in vitro* de *Cattleya* e outros gêneros: KC (Knudson, 1946); VW (Vacin & Went, 1949); Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950); H (Heller, 1953); MS (Murashige & Skoog, 1962), LS (Linsmaier & Skoog 1965); RM (Reinert & Mohr, 1967); Lind. (Lindemann *et al.*, 1970); e M (Ball *et al.*, 1971). Os mais empregados foram MS, em 29,2 % dos trabalhos, KC, em 22,2 %, VW, em 19,4 % e os demais em menos de 10,0 %.

É interessante verificar que das 72 vezes em que os meios foram citados, em 62,5 % delas utilizaram-se suas formulações modificadas. Por exemplo, o meio MS, em 66,7 % das vezes em que foi empregado, foi modificado na concentração dos sais com nutrientes, o mesmo acontecendo com os meios KC, RM, VW e H em 75 %, 33,3 %, 85,7 % e 85,7 % dos casos, respectivamente.

De todas as formulações, MS é a mais concentrada, possuindo todos os minerais nutrientes essenciais. Segundo Arditti & Ernst (1992), as outras formulações, especialmente aquelas mais antigas, como as de Knudson e Vacin-Went, incluem somente manganês como micronutriente. A razão para isto pode talvez ser explicada pelo fato de os micronutrientes serem requeridos no meio em baixas concentrações, podendo suas exigências serem atendidas pelas impurezas presentes nos demais sais e outros componentes do meio. Outra possível explicação é que as formulações KC e VW datam-se,

respectivamente, de 1946 e 1949, quando os processos de purificação dos sais e os estudos de nutrição mineral eram ainda poucos desenvolvidos.

Preferencialmente, tem-se utilizado o meio inicial e de manutenção, ambos no estado líquido, para formação de protocormóides. Para a transformação destes em plântulas, têm-se empregado o meio sólido (Leffring, 1968, citado por Pierik, 1990). Também, de preferência, no estado sólido, o meio tem sido usado para o processo de enraizamento, com a concentração variando de 6,0 a 17,5 g L⁻¹ de ágar, sendo a concentração mais utilizada 8,0 g L⁻¹ (Quadros 1a e 1b).

Observa-se nos Quadros 1a e 1b, que foi utilizada, sem exceção, sacarose como fonte de carbono, variando sua concentração de 0,05 a 3 % (p/v), predominando a concentração de 2 a 3 % (p/v) no meio inicial, 3 % (p/v) no meio de manutenção e 2 % (p/v) no meio de enraizamento. Apenas em um meio foi substituída por glicose, utilizando a concentração 2,0 mg L⁻¹ (Churchill *et al.*, 1973). Observa-se, nos mesmos quadros, que 52,8 % dos meios de cultivo não utilizaram vitaminas; 23,6 % deles usaram niacina, piridoxina e tiamina, sendo 0,5; 0,5; e 0,1 mg L⁻¹ as respectivas concentrações mais empregadas. Dos trabalhos restantes, 20,8 % utilizaram apenas tiamina, ou niacina ou piridoxina em concentrações variáveis, e apenas 2,8 % dos meios, além destas três vitaminas, utilizaram pantotenato de cálcio (0,48 mg L⁻¹), ácido fólico (4,4 mg L⁻¹) e biotina (0,024 mg L⁻¹).

É interessante verificar que em vitaminas importantes como tiamina, a partir da menor concentração utilizada, suas concentrações foram aumentadas em até 10 vezes (de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹), sendo este aumento de 2 a 5 vezes para as demais vitaminas.

Em relação aos aditivos orgânicos, a glicina foi utilizada em 13 meios ensaiados, sendo preferencial a concentração de 2,0 mg L⁻¹ e, em apenas um meio, esta concentração foi de 400 mg L⁻¹ (Kerbaux, 1991). Asparagina e ácido glutâmico foram usados nos meios inicial e de manutenção nas respectivas concentrações de 13,0 e 15,0 mg L⁻¹, juntamente com 1000 mg L⁻¹ de MES [2-(N-Morpholino) ácido etanosulfônico] apenas no meio inicial. Caseína hidrolisada foi utilizada nas concentrações de 100,0 e 1000,0 mg L⁻¹, em cinco

meios de cultivo. O mioinisol foi adicionado em 16 meios, nas concentrações de 18 e 100 mg L⁻¹. O carvão ativado foi utilizado em três meios, nas concentrações de 500 e 1000 mg L⁻¹. Alguns meios (28,2 % do total) não continham aditivos orgânicos.

Apenas Lindemann (1970), para cultivo de calo de *Cattleya* sp., adicionou ao meio de manutenção ácido citidínico (162 mg L⁻¹) e guanínico (182 mg L⁻¹). Entretanto, Arditti (1977) menciona que tecidos de *Cattleya* crescem bem nos meios carentes destes aditivos, razão pela qual o requerimento dos mesmos possivelmente não seja necessário. Peptonas foram adicionadas no meio inicial, com a concentração de 2000 mg L⁻¹, em apenas um meio (Mauro *et al.*, 1994) .

A água de coco, como substância complexa, foi utilizada em 59 % dos trabalhos (Quadros 1a e 1b), variando sua concentração de 50 a 250 mL L⁻¹. Sendo o volume mais usado o de 150 mL L⁻¹.

A banana madura foi utilizada tão somente em meios de enraizamento e, mesmo assim, apenas em dois meios, empregando-se 60 e 150 g L⁻¹. Segundo Arditti & Ernst (1992), a polpa de banana estimula a proliferação e o desenvolvimento de protocormóides.

Com relação ao uso de reguladores de crescimento, pode-se verificar nos trabalhos resumidos nos Quadros 1a e 1b, que a auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi utilizada em concentrações que variaram de 0,1 a 10,0 mg L⁻¹, sendo 1,0 mg L⁻¹ a mais empregada. Já o ácido 3-indolacético (AIA) foi utilizado nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ e o ácido indolbutírico (AIB) em concentrações que variaram entre 0,5 e 1,75 mg L⁻¹. O ácido naftalenoacético (ANA) foi a auxina mais usada nos meios de cultivo, cujas concentrações variaram entre 0,10 e 1,75 mg L⁻¹. Sabe-se que as auxinas são responsáveis pela divisão, crescimento e alongação celular, indução de tecidos não organizados (calos), formação de raízes adventícias, porém inibem a formação de gemas axilares, sendo responsáveis, portanto, pela manutenção da dominância apical. Estimulam a embriogênese, principalmente em elevadas concentrações, e regula a morfogênese (Pierik, 1990 e George, 1993). Segundo Pierik (1990), as auxinas sintéticas (AIB, ANA e 2,4-D) são

relativamente mais ativas, utilizadas geralmente em concentrações de 0,001 a 10 mg L⁻¹.

No que se refere às citocininas, a benzilaminopurina (BAP) foi utilizada em concentrações que variaram entre 0,05 e 10,0 mg L⁻¹. A cinetina foi a mais empregada nos meios de cultivo, nas concentrações de 0,1 a 10,0 mg L⁻¹. As citocininas são utilizadas para estimular o crescimento e o desenvolvimento. Geralmente, são necessárias para a divisão celular, provavelmente por regular a síntese da proteína envolvida na formação e fusão dos fusos mitóticos (George, 1993). Em concentrações mais elevadas (1 a 10 mg L⁻¹) podem induzir a formação de gemas adventícias, quebrando a dominância apical e retardando a formação de raízes (Pierik, 1990).

As giberelinas (GA₃), segundo Caldas *et al.* (1998), podem ser úteis para induzir o desenvolvimento de partes aéreas e sua inclusão nos meios de cultivo é pouco freqüente, em razão de um suprimento endógeno suficiente. O GA₃ foi empregado apenas duas vezes no meio, com a concentração de 0,35 mg L⁻¹.

O sulfato de adenina foi utilizado em concentrações que variavam de 10 a 30 mg L⁻¹. É empregado nos cultivos *in vitro*, por apresentar efeito equivalente ao de uma citocinina de baixo espectro de ação ou pelo seu sinergismo com estes fitorreguladores no meio (Caldas *et al.*, 1998).

Segundo Arditti & Ernst (1992), as combinações de reguladores hormonais efetivas para crescimento de plântulas são 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 a 5,0 mg L⁻¹ de ANA ou 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ de cinetina e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D. A formação de parte aérea é aumentada pela adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA, ou 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D, ou 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D. A proliferação de protocormóides é aumentada com utilização de 5,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA.

Constata-se, pelos trabalhos resumidos nos Quadros 1a e 1b, que reguladores de crescimento, largamente empregados nos meios de cultivo, como foram o 2,4-D, ANA, BAP e cinetina, tiveram suas concentrações respectivamente aumentadas em até 11, 100, 200 e 1000 vezes.

O pH dos meios de cultivo para *Cattleya* variou de 5,0 a 5,8, com a maioria dos trabalhos usando pH 5,7. O controle do pH é importante, pois

segundo Arditti & Ernst (1992), quando o pH inicial é muito ácido antes da autoclavagem, pode ocorrer a hidrólise de alguns componentes do meio.

7. Condições de incubação

Para os trabalhos de cultivo *in vitro* com orquídeas, a temperatura da sala de incubação dos diferentes laboratórios tem variado entre 22 e 30 °C e a maioria dos trabalhos desenvolveu em uma temperatura de 25 ± 2 °C (Quadros 1a e 1b).

O fotoperíodo nas salas de cultivo variou desde escuro contínuo à luz constante, em trabalhos com os mesmos objetivos, e empregando, como explantes, ápices caulinares para formar protocormóides. Segundo Arditti & Ernst (1992), há uma evidência de que o fotoperíodo de 12 a 18 horas é adequado para a maioria dos tecidos vegetais. Em geral, fotoperíodos e irradiâncias propícios para germinação de sementes de orquídeas e crescimento de plântulas são também adequados para cultura de seus tecidos.

Pelos Quadros 1a e 1b, observa-se que a irradiância variou de 9 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Arditti & Ernst (1992) mencionam que muitas das culturas são iluminadas mediante uso de lâmpadas fluorescentes, com ou sem adição de algumas lâmpadas incandescentes. Entretanto, muitos trabalhos não citam o fotoperíodo, tão pouco a irradiância e o tipo de lâmpadas utilizadas.

Apêndice

Quadro 1a -Sumário de experiências em morfogênese realizadas em orquídeas do grupo *Cattleya**

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) pH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Cattleya sp.</i>	Gemas laterais intumescidas obtidas dos rizomas abaixo das brotações novas	Reinert-Mohr (1,5-3,0)	Niacina:0,5 Piridox.:0,5 Tiamina: 0,1 pH: 5,0	Ác. Cítrico:150,0 Glicina: 2,0	IBA: 1,75 ANA: 1,75	Gemas expandidas	T: 24 a 28°C F: 16 h I: 37,2 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 2rpm	Reinert & Mhor, 1967
	Gemas expandidas	Reinert-Mohr, (1,5-3,0)	Idem (0,6)	Idem Mioinositol: 100	Idem Kin: 1,0	PLBs e plântulas	Idem A: nenhuma	
<i>Cattleya sp.</i>	Meristemas laterais removidos de brotos vegetativos de 1-8 cm de comprimento	Vacin-Went, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,0-5,2	CW: 250	Nenhum	PBLs	T: 26 ± 4°C F: luz contínua I: 19-34 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 160 rpm	Scully, 1967
	PBLs, calos	Idem	Nenhuma pH: 5,0-5,2 (0,9)	Idem	Nenhum	Plântulas	Não citados	
<i>Cattleya sp.</i>	Gemas axilares não-dormentes em expansão	Lindemann <i>et al.</i> , (0,05)	Nenhuma pH: 5,2-5,5	Água de coco 150	ANA: 1,0 KIN: 0,2	Gemas expandidas	T: não citada F: não citado I: não citada A: não citado	Lindemann <i>et al.</i> , 1970
	Gemas expandidas	Lindemann <i>et al.</i> , (2)	Pant.Ca: 0,48 Piridox.: 0,21 Ác.fólico:4,4 Tiamina:0,34 Biotin.:0,024 Niacina: 1,22 pH: 5,2	Inositol: 18 Ác. glutâmico.:15 Asparagina: 13 Ác.guanídico.:182 Ác.citidínico.:162 Ág. coco: 50-150 Caseína hid.:100	ANA: 0,18 GA3: 0,35 KIN: 0,22	Protocormóides	Idem	
	Protocormóides e calo	Knudson C modif. (2)	Nenhuma pH: 5,3 (1,2-1,5)	Nenhum	Nenhum	Plântulas	T: não citada F: não citado I: não citada A: ausência	

*Resumos extraídos de revisões feitas por Arditti (1977) e Arditti & Ernst (1992)

Quadro 1a - Continuação

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) PH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Cattleya</i> sp.	Gemas da base das brotações novas	MS, modif. (3)	Niacina: 0,5 Piridox.: 0,5 Tiamina: 0,1 pH: 5,2 - 5,5	Água-coco: 150 Mioinositol: 100 Glicina: 2 Ác. glutâmico: 15 Asparagina: 13	ANA: 0,1 KIN: 0,2	PLBs	T: 25 a 30° C F: escuro I: não citado A: 2rpm	Morel, 1970
		MS, modif. (3)	Idem	Mioinositol: 100 Glicina: 2 Ác. glutâmico: 15 Asparagina: 13 Cas. hidrol.: 100	Idem	Idem	Idem	
		Meio inicial, Lindermann (0,05)	Nenhuma pH: 5,2 - 5,5	Água-coco: 150	ANA: 1,0 KIN: 0,2	Idem	Idem	
		Meio de manutenção, Lindermann (2)	Pant. Ca: 0,48 Piridox.: 0,21 Ác. fólico.: 4,4 Tiamina: 0,34 Niacina: 1,22 Biotina: 0,024	Inositol: 18 Ác. glutâm.: 15 Asparagina: 13 CW: 50-150 Cas. hidrol.: 100	ANA: 0,18 GA ₃ : 0,35 KIN: 0,22	Idem	Idem	
		Knudson C, modif. (2)	Nenhum (1,75)	Nenhuma	Nenhum	Idem	Idem	
		Knudson C, modif. (2)	Nenhuma (1,2-1,5)	CW: 150 Ác. glutâm.: 15 Asparagina: 13	ANA: 0,1 KIN: 0,2	Idem	Idem	

Quadro 1a - Continuação

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) PH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Cattleya</i> sp.	PLBs	Knudson C, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,3 (1,2-1,5)	Nenhuma	Nenhum	Enraizamento e formação de plântulas	T: não citada F: não citada I: não citada A: nenhuma	Morel, 1970
<i>Cattleya</i> sp.	Folhas removidas de plântulas originadas de semente germinadas <i>in vitro</i>	Heller modif. (2,0)	Nenhuma PH: 5,3 (0,8)	Nenhum	KIN: 1,0	PLBs	Segundo Morel, 1971, 1974	Champagnat <i>et al.</i> , 1970
<i>Cattleya</i> sp.	Apíces são obtidos de folhas jovens de plantas adultas antes do aparecimento do nó	Meio inicial, Heller, modif. (3)	Tiamina: 1,0 pH: 5,3	Nenhum	2,4-D: 1,0	PLBs	T: 22-25° C F: 18 horas I: 9-19 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 60 oscilações/ min.	Arditti <i>et al.</i> , 1971; Ball <i>et al.</i> , 1971; Churchill <i>et al.</i> , 1971, 1972, 1973
	PLBs	Meio manuten. MS, modif. (3)	Tiamina: 0,1 pH: 5,2-5,5 (1,0)	CW: 100-250 Glicina: 2,0	AIA ou ANA: 1,0 KIN: 2,6	Proliferação do PBLs – formação de folhas e ápices vegetativos	Idem A: -	
		Linsmaier-Skoog, (3)	Tiamina: 0,4 PH: 5,5	Mioinositol: 100	KIN: 0,1 AIA: 2,0	Idem	Idem	
	PBLs	Meio de diferenciação, Knudson C, modif. (2)	Nenhuma PH: 5,3 (1,2-1,5)	Banana madura: 150000	Nenhum	Plântulas	T: 22-25° C F: 12 horas I: não citado A: -	
	Protocormóides	MS, modif. (3)	Idem acima	Idem	2,4D: 10 KIN: 10	Calo	Idem acima	

Quadro 1a - Continuação

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) PH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Brassocattleya</i> Princess Patrícia	Terceira gema de caules com 15 cm, novos e em crescimento	MS, modif. (3)	Niacina: 0,5 Piridox.: 0,5 Tiamina: 0,1 pH: 5,3-5,5	Glicina: 2,0 Inositol: 100	ANA: 0,1	Protocormóides	T: 25°C F: luz contínua I: não citada A: ausência	Kako, 1973
	Protocormóides	MS, modif. (3)	Idem acima	Idem	2,4D: 10 KIN: 10	Calo	Idem	
	Calo	Knudson C, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,3 (1,2-1,5)	Banana madura: 150.000	Nenhum	Plântulas	Idem	
<i>Cattleya</i> sp.	Gemas dormentes de bulbos e porções dos rizomas de plantas maduras	Knudson C, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,0-5,2 (1,2-1,5)	Nenhum	2,4-D: 1,0	PLBs	T: 22-25°C F: 16 horas I: 37-74 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	Vajrabhaya, 1978
	PLBs	Idem	Idem	Idem	Idem	Plântula	Idem	
<i>Cattleya</i> sp.	Apices caulinares de brotações novas (2 a 5 cm) de plantas adultas (gemas dormentes ou laterais também podem ser usadas)	MS, modif. (3)	Niacina: 0,5 Piridox.: 0,5 Tiamina: 1,0 pH: 5,7	Glicina: 2,0 Mioinositol: 100 Água-coco: 150 Sulf. adenina: 10	ANA: 0,1 BA: 1,0	Alongamento formação de folhas	T: 27°C (22- 29° C) F: 16 horas I: 19 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 1 rpm	Huang, 1984
	Ápices com folhas	MS, modif. (3)	Idem (0,8)	Idem Sulf. adenina: 30	ANA: 0,1 BA: 1,0	Ramificações	T: idem F: não citada I: não citada A: -	
	Ramificações com folhas	MS, modif. (3)	Idem (1,0)	Idem Sulf. adenina: 30	ANA: 0,3	Plântulas	T: idem F: não citado I: 112-130 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	

Quadro 1b - Experiências em morfogênese realizadas em orquídeas do grupo *Cattleya* e outros gêneros

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) pH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Cattleya aurantiaca</i> Rolf	Sementes imaturas	KC, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,1 (0,6)	Nenhum	Nenhum	Plântulas com pequenas folhas e protocormóides	T: 25°C F: Luz contínua e escuro I: - A: -	Pierik & Steegmans, 1972
	Plântulas pré-germinadas	Heller, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,1	Nenhum	Nenhum	Plântulas com formação de protocórmios e raízes	T: 25°C F: Luz contínua I: não citado A: 1 rpm	
	Plântulas com duas pequenas folhas e pequeno protocórmio (4 mm)	Heller, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,1 (0,6)	Nenhum	BA: 0,0; 0,01; 0,1; 1,0; e 10,0	Plântulas completas	T: 25°C F: Luz contínua I: não citado A: -	
<i>Epidendrum</i> cv. O'Brienium	Plântulas originadas de sementes com um ano de idade. Ápices foliares <i>in vitro</i>	MS, modif. (2)	Nenhuma pH: 5,5	Nenhum	Nenhum	Calo	T: 24 ± 2°C F: 16/8 horas I: 26, 2 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 60 rpm	Churchill <i>et al.</i> , 1973
		MS, modif. (2,0)	Nenhuma pH: 5,5 (0,8)	Nenhum	Nenhum	Calo	Idem A: -	
		M (Ball <i>et al.</i> , 1971 (1,0)	Nenhuma pH: 5,5	Nenhum	Nenhum	Nenhuma formação de calo	Idem A: 60 rpm	
		Heller	Idem	Glicose: 2,0 CW: não citado	Nenhum	Idem	Idem	
	Calo	Knudson C (2,0)	Nenhuma pH: 5,5 (não citado)	Nenhum	Nenhum	Plântulas	T: 24 ± 2°C F: 16/8 horas I: 26,2 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	

Quadro 1b - Continuação

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) PH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Laeliocattleya</i> cv. Portia Mayflower	Plantas adultas antes do desenvolvimento do nó Ápices foliares de folhas jovens	Heller, modif. (3,0)o	Nenhuma pH: 5,5	Nenhum	2,4-D: 1,0 BAP: 0,5	Protocórmios ou calo	T: 24 ± 2°C F: 16/8 horas I: 26,2 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 60 rpm	Churchill <i>et al.</i> , 1973
		Heller, modif. (3,0)o	Nenhuma pH: 5,5 (não citado)	Nenhum	2,4-D: 1,0 BAP: 0,5	Protocórmios, calo e plântulas	Idem A: -	
		MS, modif. (2,0)	Idem	Nenhum	Nenhum	Nenhuma formação de estruturas	Idem A: -	
		M (Ball <i>et al.</i> , 1971 (1,0)	Nenhuma pH: 5,5	Nenhum	Nenhum	PLBs,	Idem A: 60 rpm	
		M (Ball <i>et al.</i> , 1971 (1,0)	Nenhuma pH: 5,5 (não citado)	Nenhum	Nenhum	Plântulas	Idem A: -	
	Calo	Knudson C, modif (2,0).	Idem	Nenhum	Nenhum	Plântulas	Idem	
<i>Cattleya labiata</i> Lindl.	Calo	Reinert- Mhor, 1970, modif. (2)	Tiamina: 0,1 Ác. Nicot.: 0,5 Piridoxina: 0,5 pH: 5,5	Glicina: 2,0 Ác. cítrico: 150,1	AIB: 1,75 ANA: 1,75	Plântulas	T: 24°C F: 16/8 horas I: 150 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 1 rpm	Stoltz, 1979
<i>Vanilla planifolia</i>	Segmentos nodais do caule de plantas adultas crescidas em casa de vegetação	MS, 1962 (3)	Idem pH: 5,7 (0,8)	Inositol: 100 Glicina: 2,0 Cas. hidrol.: 1000	BA: 0 a 1	Calos proliferados	T: 26°C F: 16/8 horas I: 25 a 100 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	Kononowicz & Janick, 1984
	Calos proliferados	Idem	Idem	Idem	BA: 0,0; 0,5; 1,0; e 5,0	Plântulas	Idem	

Quadro 1b - Continuação[illegible]

Quadro 1b - Continuação

ESPÉCIE	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg L ⁻¹) PH (%) ÁGAR	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg ou mL L ⁻¹)	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg L ⁻¹)	ESTRUTURAS FORMADAS	INCUBAÇÃO T: TEMPERATURA F: FOTOPERÍODO I: IRRADIÂNCIA A: AGITAÇÃO	AUTORES
<i>Aranda Deborah</i> (<i>Arachnis hookeriana</i> (Rchb. F) Rchb. F. x <i>Vanda lamemmata</i> Lindl.)	PLBs	VW, modif. (não citado)	Idem (líq.)	CW: 200	Nenhum	Plântulas	Idem	Prakash <i>et al.</i> , 1995
	PLBS	Idem	Idem	CW: 150	Nenhum	Plântulas	Idem	
	PLBs	Idem.	Idem (0,7)	CW: 100 Carvão ativ.: 500	Nenhum	Plântulas	Idem	
<i>Cattleya</i> sp. <i>Aranda</i> sp. <i>Dendrobium</i> sp. <i>Mokara</i> sp. <i>Oncidium</i> sp. <i>Spathoglottis</i> sp. <i>Vanda</i> sp.	Híbridos cultivados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Âpices caulinares Folhas novas Inflorescências PLBs em desenvolvimento Secções transversais (0,6m)	VW KC MS (1,0 – 3,0)	Nenhuma pH: não citado (não citado)	CW: 50-250	BA: 0,5 a 2,0 ANA: 0,24 a 1,02	PLBs e plântulas	T: 26° C F: 16/8 horas I: 25 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: 120 rpm	Prakash <i>et al.</i> , 1996
<i>Sophrolaeliocattleya</i> Jewel Box ‘Schherezade’ X <i>Brassolaeliocattleya</i> Rugley’s Mill ‘Mendenhall’	Plântulas <i>in vitro</i>	MS(½, ¼ e 1) Hoagland Knudson C modif. Lindemann VW (3,0)	Tiamina: 1,0 Ác. Nicot.: 0,5 Piridoxina: 0,5 pH: 5,7 (não citado)	Inositol: 1,0 Glicina: 2,0	ANA: 0,3 Sulfato adenina: 30	Mudas	T: 23 ± 2° C F: 16/8 horas I: 44 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	Adelberg <i>et al.</i> , 1997
<i>Catasetum fimbriatum</i> Lndl.	Caule estiolado Segmento de ponta de raiz	VW, modif. (2,0)	Nenhuma pH: 5,8 (0,7)	Nenhum	Nenhum	Plântulas	T: 25 ± 2° C F: 16/8 horas I: 40 µmol.m ⁻² .s ⁻¹ A: -	Peres & Kerbauy, 1999

Objetivos

Observa-se, pela revisão de literatura, que há real necessidade de realizar estudos que viabilizem o uso da cultura de tecidos para a produção massal de espécies raras, em vias de extinção, de híbridos ou qualquer outra orquídea de interesse botânico, ecológico ou econômico. Demonstra, também, a descrição de artigos conflitantes, com informações contraditórias ou omissões de detalhes nas metodologias utilizadas, visando os estudos morfogênicos *in vitro* de orquídeas. Verificou-se, no entanto, que o grupo *Cattleya*, apesar de seu elevado potencial ornamental e econômico, é o que tem apresentado as menores respostas. O objetivo deste trabalho foi no primeiro momento estabelecer alguns ensaios (total de três), para se ter uma idéia prévia do comportamento morfogênico de plantas deste grupo *in vitro*.

No primeiro ensaio, objetivou-se verificar a capacidade morfogênica de segmentos de raízes do híbrido avançado de *Brassocattleya* Daffodil x *Sophrolaeliocattleya* Hazel Boyd 'Sunset', em que novas estruturas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de plântulas. No segundo, o propósito era avaliar a capacidade de formação de novas plântulas, o crescimento e a resposta morfogênica de calos oriundos de sementes germinadas *in vitro* de *Laelia anceps* alba, quando recultivados e subcultivados. No terceiro ensaio, o objetivo foi determinar a capacidade morfogênica de gemas axilares dos híbridos *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel' e *Cattleya* White Dream, bem como avaliar a eficiência da metodologia usada para a desinfestação.

Com base nas respostas dos ensaios, foram montados alguns experimentos mais bem elaborados. O objetivo do experimento descrito no segundo capítulo foi verificar a capacidade morfogênica a partir de segmentos de plântulas obtidas pela via seminífera de *Brassocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia purpurata* e estabelecer um meio de cultivo eficiente, com adequado balanço hormonal de auxina/citocinina, utilizando 2,4-D e BAP. O experimento do terceiro capítulo objetivou determinar a capacidade morfogênica de ápices

caulinares e gemas axilares de *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* alba e estabelecer o melhor modo de preparação dos explantes deste híbrido. No experimento do quarto capítulo foi verificada a capacidade morfogênica de segmentos de pedúnculos de inflorescência do híbrido *Cattleya* White Dream, em que as novas estruturas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de plântulas.

ENSAIOS

Capítulo 1

**Morfogênese *in vitro* em explantes de raízes de
plântulas juvenis provenientes de sementes de
Brassocattleya Daffodil x *Sophrolaeliocattleya* Hazel
Boyd ‘Sunset’**

Ensaio 1

Resumo

O cultivo *in vitro* de extremidades radiculares pode ser um importante explante para algumas espécies de orquídea, por estar disponível em quantidade e não comprometer o desenvolvimento da planta-matriz. O objetivo foi determinar a capacidade morfogênica de segmentos de raízes de *BC Daffodil* x *SLC Hazel Boyd 'Sunset'* extraídas de plântulas desenvolvidas *in vitro*. Os segmentos de raízes foram cortados transversalmente, formando seções de aproximadamente 2 mm. Estes explantes foram inoculados em meio de cultivo líquido com a formulação de Murashige & Skoog (1962), acrescentado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Como tratamentos, foram utilizados dois tipos de explantes, ápice radicular e demais segmentos das raízes, que foram inoculados em frascos erlenmeyers com 5 e 10 explantes, respectivamente. Os frascos erlenmeyer contendo os explantes foram incubados na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, sob agitação 60 rpm em um agitador orbital, incubados no escuro por uma semana. Após, na mesma sala de cultivo, foram transferidos para ambiente com luz, com irradiância de 36,5 µmol m⁻² s⁻¹, com um fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Depois de 170 dias de cultivo, não se observou resposta morfogênica dos explantes, que se mostravam intumescidos e completamente oxidados. Essa ausência da resposta morfogênica pode ser explicada pelo alto grau de diferenciação das células dos explantes. Embora o experimento não tenha obtido êxito, pode-se futuramente testar o mesmo método utilizando-se raízes com idades fisiológicas menos avançadas, meios de cultivo com outras concentrações de auxina/citocinina para estimularem a resposta morfogênica dessa espécie.

Palavras-chave: ápices radiculares, segmentos radiculares, cultura de tecido.

Introdução

Atualmente, no mundo inteiro, têm-se utilizado técnicas de cultura de tecido para a propagação de orquídeas. Muitos laboratórios comerciais de propagação *in vitro* estão associados aos orquidários e produtores de orquídeas, sendo estas propagadas em grande escala (George, 1993).

Segundo George & Sherrington (1984), diversos tipos de explante foram utilizados para a propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*. Por exemplo, ápice caulinar (Morel, 1964, 1965); gemas laterais e protocormóides subdivididos (Reinert & Mohr, 1967); folhas jovens de plântulas (Champagnat *et al.*, 1970); ápices meristemáticos (Lindemann *et al.*, 1970); ápices caulinares de gemas dormentes de pseudobulbos (Vajrabhaya, 1978); ápices meristemáticos e base foliar (Lim-Ho, 1982); todos eles resultando em proliferação de protocormóides e, ou, plântulas.

O desafio maior durante séculos foi saber qual a possibilidade de um meristema apical de raiz originar um meristema caulinar. Em 1890, Rostowzew, citado por Kerbauy (1998), afirmou que a verdadeira conversão de ápices radiculares em gemas, em angiospermas, ocorria apenas em *Neottia nidus-avis*, uma orquídea terrestre do hemisfério-norte, e em *Anturium longifolium*.

Por esta razão, como citado por Kerbauy (1998), é na família Orchidaceae que os estudos de conversão direta de raízes têm-se mostrado promissores. Por meio de estudos *in vitro*, segundo este mesmo autor, pode-se dividir em dois grupos distintos algumas orquídeas epífitas brasileiras, em relação ao potencial morfogênico de ápices radiculares: o primeiro grupo refere-se às espécies que apresentam organogênese direta, cujos ápices radiculares podem ser diretamente convertidos em gemas, conforme se observou em praticamente todas as espécies dos gêneros *Catasetum*, *Cychnoches*, *Mormodes*, *Clowesia* e *Chisis* (Kerbauy, 1993). O segundo grupo, refere-se às espécies que apresentam organogênese indireta, nas quais as formações de gemas necessitam de um estágio de calo, conforme verificado

em *Oncidium*, *Cattleya* (Kerbaudy, 1984, 1991) e *Epidendrum* (Stewart & Button, 1978), citados por Kerbaudy (1998).

Certas espécies têm-se mostrado recalcitrantes à indução de protorcomóides, como dos gêneros *Laelia* e *Sophronitis*. Considerando-se o fato de que as células vegetais são totipotentes, é necessário saber se o termo recalcitrante diz respeito a uma característica intrínseca de um determinado tecido, órgão ou espécie ou, simplesmente, não foi descoberta uma rota desejável de desenvolvimento para induzi-lo a tal (Kerbaudy, 1998).

Tanto em *Oncidium* quanto em *Cattleya*, a adição ao meio de cultivo de uma auxina sintética, ANA ou 2,4-D respectivamente, mostrou-se fundamental à formação de calos e, a partir deles, das gemas. A presença de citocininas no meio de cultivo inibiu o crescimento do explante, a formação de raízes laterais e de calos (Kerbaudy, 1998).

Este tipo de explante, por ser abundante, pode ser testado como alternativa na produção de plântulas homogêneas, mantendo as características florais desejáveis de uma espécie ou híbrido, sem atrasar o desenvolvimento normal da planta-matriz. É de fundamental importância ter um meio de cultivo com um balanço adequado da relação auxina/citocinina para desenvolvimento de calos e plântulas.

Neste trabalho, ensaiaram-se segmentos de raízes do híbrido avançado de *Brassocattleya* Daffodil x *Sophrolaeliocattleya* Hazel Boyd 'Sunset', objetivando verificar a capacidade morfogênica destes explantes, em que novas estruturas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de plântulas.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Origem e tipo de explante

Os explantes foram extraídos de plântulas de *Brassocattleya* Daffodil x *Sophrolaeliocattleya* Hazel Boyd 'Sunset', com nove meses de idade, obtidas pela via seminífera *in vitro*.

As sementes foram germinadas e crescidas em meio com a formulação de Knudson, 1946, adicionados a este 100 g L⁻¹ de banana-nanica extraída de frutos com a casca no estágio de coloração 3 (casca do fruto mais verde que amarela) (Dadzie & Orchard, 1996), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,0 a 5,5, antes da adição do ágar. Após sua preparação, o meio foi distribuído em frascos de vidro, previamente esterilizados. Estes recipientes foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac®) e mantidos em casa de vegetação.

O período de incubação foi de nove meses, quando as plântulas, com 1 a 3 cm de comprimento, foram utilizadas para a extração dos explantes usados na condução deste experimento.

Foram utilizados, como explantes, ápices e segmentos extraídos das raízes, com aproximadamente 2 mm de comprimento.

2. Composição, preparação e esterilização do meio de cultivo

O meio utilizado para cultivo dos explantes constituiu-se dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionando 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural, 0,5 mg L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina) e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, sendo, posteriormente, distribuídos 40 mL de meio em erlenmeyers de 125 mL, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 30 minutos, para o cultivo de ápices radiculares. Para os demais segmentos radiculares, foram distribuídos 80 mL de meio em erlenmeyers de 250 mL, previamente esterilizados, como citado. Após a distribuição dos meios, estes erlenmeyers foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e papel alumínio. A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C e pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, cinco ápices radiculares em erlenmeyers de 125 mL e aproximadamente 10 segmentos de raízes em erlenmeyers de 250 mL foram inoculados no meio de cultivo à temperatura ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os erlenmeyers foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e totalmente envolvidos em papel alumínio, para protegê-los contra luz.

3. Condições de incubação

Os erlenmeyers foram colocados na sala de cultivo, à temperatura de $27 \pm 2 \text{ °C}$, sob agitação orbital de 60 rpm em um agitador orbital. Os explantes, incubados no escuro, por uma semana, foram posteriormente transferidos, nesta mesma sala, para condição de fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $36,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W), e mantidos sob iguais condições de agitação. Nestas condições, os explantes permaneceram por 110 dias. Durante este período de incubação, o meio de cultivo não foi trocado.

4. Características avaliadas

Para analisar a capacidade morfogênica dos explantes de segmentos de raízes da planta em estudo, avaliaram-se a taxa de sobrevivência, o estado de oxidação e a formação de calos, além da coloração do meio de cultivo.

5. Delineamento experimental

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os dois tipos de explantes, ápices radiculares, com cinco explantes por erlenmeyer, com 20 repetições, e os demais segmentos extraídos das mesmas raízes, contendo em cada erlenmeyer aproximadamente 10 explantes, totalizando 10 repetições.

Os dados de taxa de sobrevivência, estado oxidativo e formação de calo foram analisados descritivamente, por meio de observações visuais.

6. Recultivo

Após 110 dias, os explantes foram recultivados em meio de cultivo, cuja composição química foi a mesma do meio do cultivo inicial, ou seja, minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), mais 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

O meio de cultivo teve o pH ajustado em 5,7 ± 0,1. Posteriormente, foram distribuídos 20 e 40 mL de meio, respectivamente, em erlenmeyers de 125 mL e de 250 mL, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 30 minutos. Após a distribuição dos meios, estes erlenmeyers foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e papel alumínio. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C, pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os ápices radiculares foram inoculados no meio de cultivo, em erlenmeyers de 125 mL, com quatro repetições. Os demais segmentos radiculares foram inoculados em dois erlenmeyers de 250 mL, à temperatura ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os erlenmeyers foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®).

6.1. Condições de incubação

Os erlenmeyers foram colocados na mesma sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, sob agitação de 60 rpm, em um agitador orbital. Sob

as mesmas condições de fotoperíodo, 16/8 h (luz/escuro), e irradiância de 36,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W), e mantidos sob iguais condições de agitação. Nestas condições, os explantes permaneceram por mais 87 dias.

6.2. Características avaliadas e análise estatística

Avaliaram-se as mesmas características: taxa de sobrevivência, estado de oxidação e formação de calos, além da coloração do meio de cultivo, após completar 197 dias de cultivo.

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os dois tipos de explantes, ápices radiculares, com cinco explantes por erlenmeyer, com quatro repetições, e os demais segmentos extraídos das mesmas raízes, contendo em cada erlenmeyer aproximadamente 10 explantes, totalizando duas repetições.

Os dados observados foram analisados descritivamente, por meio de observações visuais.

Resultados e discussão

Análises visuais dos explantes e meio de cultivo foram realizadas periodicamente. Nos primeiros nove dias de cultivo, os explantes não mostraram alteração de cor e apresentaram-se intumescidos. Aos 18 dias, estas características mantiveram-se e os explantes haviam experimentado, ademais, certo crescimento longitudinal, e o meio de cultivo permanecia com sua cor aparentemente normal. Foi interessante verificar que, após 51 dias de cultivo, o meio continuava não apresentando alterações visuais de cor; entretanto, os explantes estavam completamente oxidados e sem evolução da resposta morfogênica observada aos 18 dias. Estas características do meio de cultivo e dos explantes mantiveram-se até aos 110 dias, quando os explantes foram recultivados.

Após 87 dias de recultivo, sob as mesmas condições de incubação, observou-se que os explantes, em sua totalidade, além de completamente oxidados, estavam mortos e sem evidências de respostas morfogênicas. Portanto, não se obteve êxito neste experimento.

Quando se utilizam explantes extraídos de plântulas germinadas e crescidas *in vitro*, não é necessária a desinfestação. Isto ficou demonstrado no final do experimento, pelo baixo número de erlenmeyers com contaminação, ou seja, 3,3 % de um total de 30 frascos permaneceram sem contaminação. Porém, um dos erlenmeyer de 125 mL, contendo ápices radiculares, após 63 dias de recultivo, foi descartado, por estar aparentemente contaminado, pois o meio apresentava turbidez aparente.

Champagnat (1971), citado por Kerbaudy (1998), observou que, do ponto de vista fisiológico, as raízes mais velhas eram mais propensas à conversão para meristema caulinar, do que as raízes mais jovens. De acordo com Kerbaudy (1998), as seções proximais do explante radicular têm-se mostrado mais favoráveis, tanto à proliferação celular quanto à conseqüente formação de calos.

Kerbaux (1991) obteve êxito na conversão de células da extremidade de raiz em protocormóides, quando utilizou segmentos de ápices radiculares com 1,0 cm de comprimento de plântulas de um híbrido de *Cattleya* (*C. nobilior* Rchb. F. x *C. loddigessi* Ldl). Estudou ainda os efeitos dos hormônios 2,4-D, ANA, AIB e BAP, bem como o efeito de baixas concentrações de amônio, glutamina e água de coco adicionados ao meio basal de Vacin-Went (1949). Concluiu-se que para o estabelecimento de cultura inicial de ápices radiculares de *Cattleya* e subsequente formação de protocormóides, o 2,4-D foi mais efetivo. A utilização de ANA e AIB foi positiva apenas no crescimento longitudinal dos explantes. Segundo o mesmo autor, a aparente falta de resposta morfogênica para a formação de calo em *Cattleya* em meio de cultivo com BAP pode refletir a autonomia dos meristemas radiculares em relação às citocininas. Similar resposta à aplicação de citocinina foi também observada em cultura de raízes de *Oncidium* (Kerbaux, 1984). Uma relação inversa pode existir entre níveis relativamente altos de citocininas endógena e embriogênese.

Outro motivo provável para os explantes não apresentarem respostas morfogênicas deveu-se a diferentes graus de competência e de diferenciação celular que podem ser encontrados nos meristemas apicais radiculares. Como relatado por Kerbaux (1998), certas respostas específicas de diferentes partes da planta são determinadas pela competência das células-alvo, de tal forma que os fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, por si só, não controlam o padrão de diferenciação celular. Entendendo-se como diferenciação o processo mediante o qual as células tornam-se progressivamente especializadas, tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Embora não se conheça ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos morfogênicos *in vitro* são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que estas diferentes expressões morfogênicas se reflitam, de alguma forma, na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos.

Peres & Kerbaux (1999) demonstraram que a conversão direta do meristema radicular de *Catasetum fimbriatum* em gemas fundamenta em

um relativamente baixo grau de determinação de suas células comparadas a de outras orquídeas como *Oncidium* e *Cattleya*. Ainda de acordo com estes autores, segmentos de ápices destes últimos gêneros podem não ser capazes de obter um balanço endógeno adequado de auxina (ácido indolacético - AIA) e citocininas para a conversão direta de raiz à parte aérea, como ocorre em *Catasetum*. Outra explicação deve-se ao alto grau de determinação das células dos ápices radiculares de *Oncidium* e *Cattleya* que, embora capazes de estabelecer adequado balanço endógeno de AIA/citocinina, podem não formar gemas.

Trabalhos futuros deverão ser realizados para verificar como os ápices radiculares e demais segmentos podem contribuir para a propagação *in vitro* de *Cattleya*, determinando a idade fisiológica, composição do meio de cultivo e o balanço hormonal adequados.

Conclusão

Para o híbrido *Brassocattleya* Daffodil x *Sophrholaeliocattleya* Hazel Boyd 'Sunset', ápices radiculares e segmentos de raízes extraídos de plântulas com nove meses não apresentaram resposta morfogênica, segundo os procedimentos experimentais deste trabalho.

Dada a importância desse tipo de explante, novas pesquisas fazem-se necessárias, testando outros meios e condições de cultivo, de modo a induzir o processo morfogênico.

**Sucessivos recultivos e subcultivos *in vitro* de calos de
Laelia anceps alba**

Ensaio 2

Resumo

Durante o cultivo de sementes germinadas *in vitro* da espécie *Laelia anceps* alba, em um orquidário no município de Patos de Minas, observou-se a formação de calos compactos, de coloração esbranquiçada a verde, quando ocorreu, durante o verão, elevação na temperatura diurna da estufa em que estava o frasco de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de novas plântulas e calos, o crescimento e a resposta morfogênica desses calos, quando recultivados e subcultivados. Calos inteiros e subdivididos à metade constituíram os dois tratamentos, sendo recultivados e, ou, subcultivados sucessivamente aos 58 e 115 dias, com diferentes repetições, em meio de cultivo contendo os minerais nutrientes de Murashige & Skoog (1962), acrescentado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, ou, contendo os nutrientes de Knudson C (1946), adicionado ao mesmo 100 g L⁻¹ de banana-nanica extraída de frutos com a casca no estágio de coloração 3 (casca do fruto mais verde do que amarela), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. Os frascos, contendo os calos, foram incubados na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C. Inicialmente, um tratamento foi incubado no escuro, por 58 dias, posteriormente transferido para um ambiente com luz, nas mesmas condições do outro tratamento, que foi incubado diretamente sob irradiância de 48 μmol m⁻² s⁻¹, com um fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Após 235 dias, concluiu-se que em qualquer tipo de explante, calos inteiros ou divididos, independentemente do tipo de cultivo, recultivo ou subcultivo sucessivos ou intercalados e tipo de meio com minerais nutrientes diferentes, MS ou KC ocorre a formação de novos calos e desenvolvimento de plântulas em menor ou maior proporção.

Palavras-chave: orquídeas, morfogênese, cultura de tecido.

Introdução

Até a metade do século XVIII, as sementes de orquídeas eram consideradas inexistentes pelos botânicos europeus. Após sua descrição (1741-1750), levou mais 70 anos para provar que eram capazes de germinar. Segundo Arditti (1992), em 1899, Noël Bernard descobriu que as sementes de orquídeas necessitavam de uma associação simbiótica com fungos micorrízicos para germinarem. Já Knudson (1922) demonstrou que era possível a germinação assimbiótica *in vitro*, utilizando um meio de cultivo simples, contendo macronutrientes, micronutrientes e açúcar.

A partir de então, muitos meios de cultivo foram desenvolvidos para atender às necessidades específicas dos diversos gêneros, diferentes espécies e, até mesmo, para cada híbrido, considerando-se também que as condições de incubação dos tecidos ou explantes cultivados *in vitro* podem determinar o êxito ou não do processo, pois influenciam a germinação, o crescimento e desenvolvimento (Arditti & Ernst, 1992).

Segundo Pierik (1990), as sementes de orquídeas germinam geralmente a uma temperatura que varia de 20 a 25 °C, sendo pouco o conhecimento sobre dormência ou possível necessidade de frio.

Arditti & Ernst (1992) citam semelhante faixa de temperatura em que a cultura de tecido de orquídeas geralmente tem sido mantida (22 a 26 °C). Em relação a esta faixa, muitos tecidos podem ter uma estreita tolerância ou ótima temperatura específica, que pode ser determinada apenas por estudos prévios.

Em alguns casos, redução de temperatura da ordem de 4 °C, por um período de tempo, pode induzir ou modificar o crescimento e, ou, desenvolvimento. Altas temperaturas (35 a 40 °C) podem também ocasionar certos efeitos, como observado na Ásia, onde culturas de tecido de certas espécies de orquídeas têm logrado êxito quando conduzidas nestas condições (Arditti, 1992).

Durante o cultivo de plântulas da espécie *Laelia anceps* alba, germinadas e crescidas *in vitro*, em um orquidário no município de Patos de

Minas, observou-se a formação de calos compactos e de coloração esbranquiçada a verde, procedentes das sementes, quando ocorreu durante o verão elevação na temperatura diurna da casa de vegetação em que estava o frasco com as sementes, atingindo, aproximadamente, 35 a 40 °C. Algumas sementes e plântulas da mesma espécie e de outras foram mais sensíveis à alta temperatura e morreram.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de novas plântulas e calos, avaliar o crescimento e resposta morfogênica de calos oriundos de sementes germinadas *in vitro*, quando recultivados e subcultivados.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Origem da fonte de explantes e modo de obtenção

Extraíram-se os explantes de calos com oito meses de idade, obtidos a partir de sementes resultantes da autofecundação da espécie *Laelia anceps* alba colocadas para germinar *in vitro*.

O meio de cultivo para germinação das sementes constituiu-se dos minerais nutrientes de Knudson C (1946), com 100 g L⁻¹ de banana-nanica extraída de frutos com a casca no estágio de coloração 3 (casca do fruto mais verde do que amarela) (Dadzie & Orchard, 1996), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,0 a 5,5, antes da adição do ágar. Após sua preparação, o meio foi distribuído em frascos de vidro, previamente esterilizados. Estes recipientes, contendo o meio de cultivo, foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

A germinação das sementes e o crescimento e desenvolvimento das plântulas deram-se em uma casa de vegetação comum, sem o controle de luz, temperatura e umidade. Após oito meses da distribuição das sementes no meio de cultivo, estas foram submetidas a um aumento da temperatura ambiente, aproximadamente 35 a 40 °C, quando se observou a formação de calos compactos com coloração esbranquiçada a verde. Os calos formados, com diferentes tamanhos, foram utilizados como explantes neste ensaio.

Alguns frascos contendo estes materiais foram mantidos nessas mesmas condições, até completarem um ano de idade.

2. Fase morfogênica

Os calos anteriormente mencionados, apresentando diferentes tamanhos, foram utilizados inteiros ou subdivididos, para se avaliar seu potencial morfogênico (Figura 1).

2.1. Composição, preparação do meio de cultivo e inoculação dos explantes

O meio de cultivo para o crescimento e desenvolvimento dos calos constituiu-se dos minerais nutrientes de Knudson C (1946), mais 100 g L⁻¹ de banana-nanica extraída de frutos com a casca no estágio de coloração 3 (casca do fruto mais verde do que amarela) (Dadzie & Orchard, 1996), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 8 g L⁻¹ de agar (Isofarma®).

O pH do meio foi ajustado para 5,0 a 5,5, antes da adição do agar, previamente fundido em forno microondas. Após sua preparação, alíquotas de 50 mL do meio foram distribuídas em frascos estéreis de cultivo, tendo estes a capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm e altura de 12,5 cm. Estes recipientes, contendo o meio de cultivo, foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², por 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, em dois frascos, inocularam-se no meio de cultivo calos inteiros, com aproximadamente 2 a 4 mm³, e em dois outros, calos subdivididos com 1 a 3 mm³ aproximadamente. Nos quatro frascos, os calos foram eqüidistantemente distribuídos, em número variado.

Posterior à inoculação dos explantes, os frascos de cultivo foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

2.2. Condições de incubação

Os quatro frascos foram colocados em estantes na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de 60 a 70 %. Os dois frascos inoculados com calos inteiros (calos recultivados) e um dos frascos com calos subdivididos (calos subcultivados) foram incubados à luz, sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W).

O outro frasco, com calos subcultivados, foi incubado no escuro, por um período de 58 dias. Posteriormente, foi transferido, nesta mesma sala de cultivo, sob as mesmas condições de temperatura, umidade relativa, fotoperíodo e irradiância descritas anteriormente. Nestas condições, os quatro frascos permaneceram incubados por 115 dias.

2.3. Características avaliadas

Foram realizadas observações visuais, aos 58 e 115 dias de incubação, para se avaliar a resposta morfogênica (crescimento e desenvolvimento) dos calos subdivididos e recultivados.

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os dois tipos de explantes: calos inteiros, com vários explantes distribuídos em dois frascos de cultivo, constituindo-se estes as repetições; e calos subdivididos, também com vários explantes distribuídos em dois frascos, sendo estes as duas repetições.

As características avaliadas foram analisadas descritivamente.

3. Fase de recultivos e subcultivos

Após os 115 dias de incubação na fase anterior, os calos recultivados (cultivados inteiros) foram novamente recultivados (Figura 1a), ao passo que os calos subcultivados, parte deles foi novamente subcultivada (portanto, calos subdivididos) e a outra parte recultivada (Figura 1b).

Outros dois frascos contendo as plântulas que permaneceram no meio de cultivo original, após completarem um ano de idade, foram recultivadas (Figura 1c).

3.1. Composição, preparação e distribuição dos meios nos frascos de cultivo e esterilização

Conforme se observa na Figura 1 a, b e c, todos os calos recultivados e subcultivados, bem como as plântulas recultivadas, tiveram a metade dos seus explantes inoculadas em meio de cultivo com os minerais nutrientes de KC (1946) e a outra metade, inoculados em meio de cultivo com os minerais nutrientes de MS (1962).

O meio de cultivo KC constituiu-se dos minerais nutrientes de Knudson C (1946), 100 g L⁻¹ de banana-nanica extraída de frutos com a casca no estágio de coloração 3 (casca do fruto mais verde do que amarela) (Dadzie & Orchard, 1996), 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 8 g L⁻¹ de agar (Isofarma®). O pH do meio foi ajustado para 5,0 a 5,5, antes da adição do ágar, previamente fundido em forno microondas.

O meio MS constituiu-se dos minerais nutrientes de Murashige & Skoog (1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. O meio de cultivo teve o pH ajustado em 5,7 ± 0,1, antes da adição de ágar (Isofarma®), 8 g L⁻¹, previamente fundido em forno microondas.

Após a preparação do meio, este foi distribuído à razão de 40 mL por frasco de cultivo, tendo este recipiente a capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 6,8 cm, interno de 6,5 cm e altura de 12,5 cm.

Os frascos contendo o meio de cultivo foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², por 20 minutos.

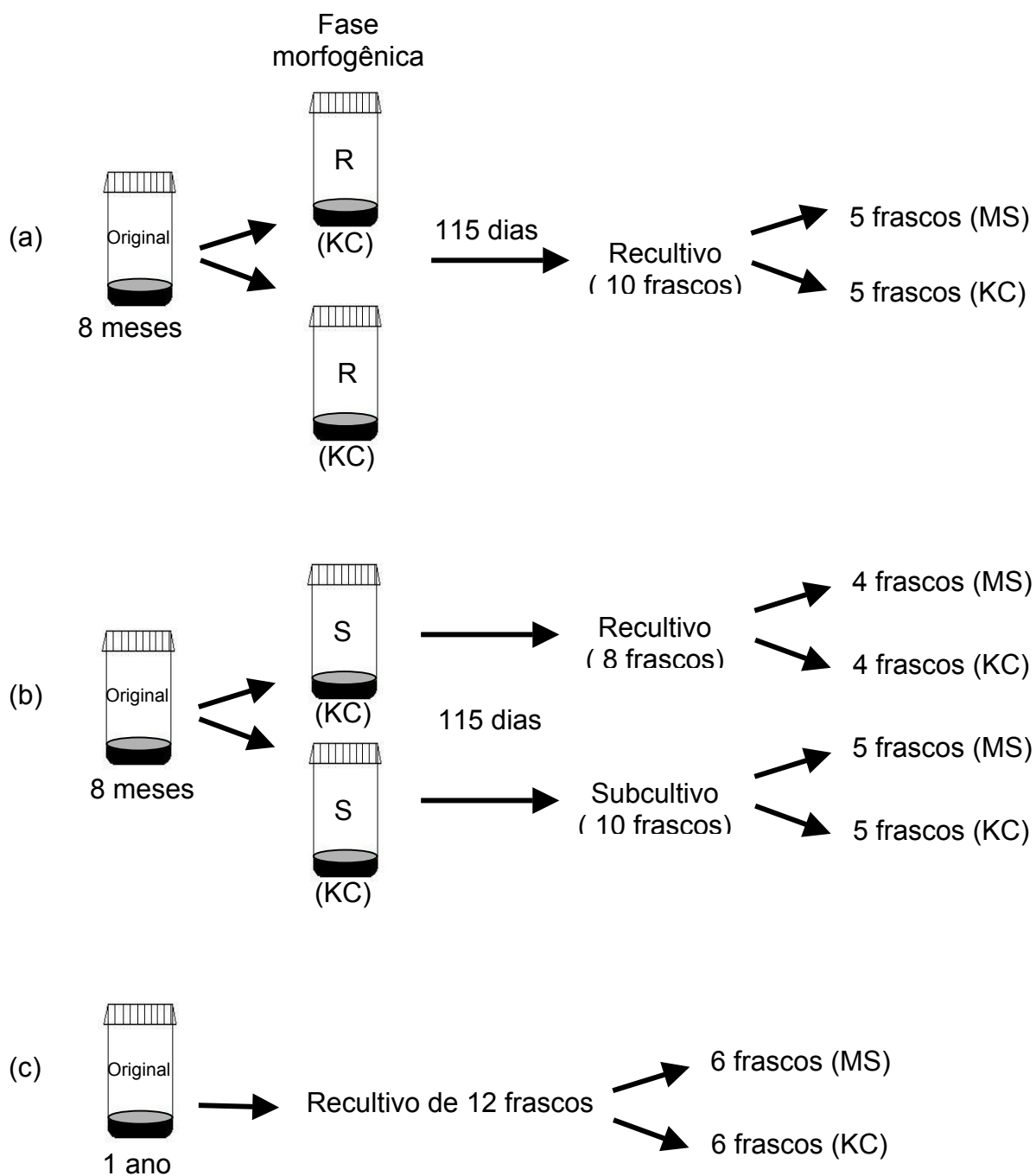


Figura 1 - Esquema ilustrativo dos recultivos (R), subcultivos (S) dos calos e tipos de meios de cultivo utilizados (Murashige & Skoog ou Knudson C). (a) Primeiro e segundo recultivo; (b) Primeiro subcultivo e posterior subcultivo e recultivo; e (c) Recultivo das plântulas que permaneceram nos frascos originais.

3.2. Inoculação dos explantes nos frascos de cultivo

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os calos recultivados, subdivididos e plântulas foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente. Posteriormente, os frascos de cultivo foram de novo fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac®).

3.3. Condições de incubação

Na sala de cultivo, os frascos foram dispostos em estantes, a uma distância aproximada de 5 cm uns dos outros e mantidos a uma temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W).

Nestas condições, os explantes permaneceram por mais 138 dias.

3.4. Características avaliadas

Foram realizadas observações visuais após 138 dias do último recultivo e, ou, subcultivo, para se avaliarem a resposta morfogênica dos calos e a capacidade de formação de plântulas. Para isso, foram considerados os aspectos visuais de coloração, crescimento e desenvolvimento dos calos e plântulas, bem como a relação de plântulas e calos formados em cada frasco com os respectivos meios de cultivo.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os dois tipos de explantes: calos inteiros e subdivididos, com vários explantes distribuídos nos frascos de cultivo. Bem como dois tipos de meio de cultivo (MS e KC).

Os explantes recultivados duas vezes tiveram cinco repetições com o meio de MS e cinco com o meio KC (Figura 1a).

De modo semelhante, também os explantes subcultivados duas vezes tiveram o mesmo número de repetições (5) em cada tipo de meio de cultivo

anteriormente mencionado. Os que foram subcultivados e posteriormente recultivados tinham quatro repetições em cada meio de cultivo (Figura 1b).

As plântulas e os calos que permaneceram nos meios de cultivo original e foram recultivados, tinham seis repetições em cada meio (Figura 1c), sendo utilizados como testemunha para outros tratamentos.

As características avaliadas foram analisadas descritivamente.

Resultados e discussão

a) Fase morfogênica

Observou-se, após 58 dias de cultivo, que os calos recultivados desenvolveram até formar plântulas. Com relação aos subcultivados, quando incubados desde o início sob condições luminosas, houve proliferação deles e formação de plântulas. Estas desenvolveram em menor número, se comparadas com as desenvolvidas a partir dos calos apenas recultivados. Os calos subcultivados e mantidos no escuro por esse mesmo período também formaram novos calos, entretanto, em pequena quantidade, apresentando-se despigmentados e com reduzido crescimento aparente. Estes posteriormente foram transferidos para a condição luminosa.

Depois de 115 dias de cultivo, antes do recultivo e, ou, subcultivo dos explantes nos diferentes meios de cultivo, realizou-se uma avaliação dos mesmos. Os explantes apenas recultivados continuavam a formar plântulas, os subcultivados, como anteriormente, formavam mais calos e alguns desenvolviam em plântulas, os subcultivados e que se mostravam despigmentados e com reduzido crescimento, quando transferidos para um ambiente de luz, após 58 dias, continuaram a apresentar crescimento lento, adquirindo coloração esverdeada, com a formação de novos calos e desenvolvimento de reduzido número de plântulas.

b) Fase de recultivos e subcultivos

Aos 138 dias após o último recultivo e, ou, subcultivo, quando o experimento completou 253 dias totais de cultivo, outra avaliação foi realizada.

Dos explantes apenas recultivados, dois frascos de cultivo de cada meio, MS e KC, apresentavam-se com elevado número de plântulas com desenvolvimento vigoroso, coloração verde normal e formação de sistema radicular. Nos três frascos restantes, contendo meio de cultivo MS, observou-se formação de calos com a coloração amarelada e plântulas verdes também vigorosas, numa proporção de um calo para nove plântulas. Comportamento

semelhante foi observado nos três frascos contendo meio de cultivo KC, porém numa proporção de calos e plântulas de 2:8.

Quanto aos explantes que foram apenas subcultivados, observou-se em meio de cultivo MS formação de calos e plântulas em iguais proporções. As plântulas apresentavam-se pequenas e em grande número, com coloração variando de alba a verde mais escuro. Analogamente, o mesmo comportamento foi verificado nos explantes mantidos em meio de cultivo KC, com exceção das plântulas, que se apresentavam mais claras.

Melhor desenvolvimento de plântulas, apresentando coloração verde mais intensa e maiores alturas, foi observado em frascos com meio de cultivo MS procedentes de explantes que primeiramente foram subcultivados e posteriormente recultivados. A formação de calos também foi verificada numa proporção de 3:7, com a coloração variando de branco a verde, inclusive com algumas plântulas albinas, porém em número muito baixo. Destes mesmos explantes, recultivados em meio KC, a formação de calos foi maior que no meio anterior (relação 4:6) e as plântulas formadas mostraram-se maiores e com coloração verde mais intensa em comparação àquelas que se formaram quando os explantes foram subcultivados duas vezes.

As plântulas e alguns calos que permaneceram no meio de cultivo original, que foram recultivados ao completar um ano de idade, após 138 dias do recultivo, foram avaliados. Por problema de contaminação, dois frascos foram eliminados. Seis frascos contendo meio de cultivo MS apresentaram formação de calos e plântulas em proporções iguais, sendo as plântulas vigorosas e com coloração verde intensa; cinco frascos com meio KC mostraram-se comportamento semelhante, sendo que os calos e as plântulas apresentavam diferentes estádios de desenvolvimento, com a coloração de ambos variando de branco a verde.

Independentemente de os calos serem inteiros ou divididos, qualquer que tenha sido o tipo de cultivo, recultivo ou subcultivo sucessivos ou intercalados e tipo de meio MS ou KC, ocorreu formação de novos calos e desenvolvimento de plântulas, cujas proporções dependeram do método adotado.

É interessante verificar que, aparentemente, foi no meio MS que houve formação de maior número de plântulas, sendo estas mais vigorosas, e também menor formação de calos. Isto somente foi possível ao recultivar por duas vezes os explantes, os quais haviam sido subcultivados e, posteriormente, recultivados. Quando os explantes eram apenas subcultivados, a formação de novos calos era maior (Figura 2).

Observações análogas foram relatadas por Morel (1960), citado por George (1993), referentes ao cultivo de ápices caulinares de *Cymbidium* em um meio simples sem reguladores de crescimento. Grande número de estruturas semelhantes a protocormos foi formado. Quando estas estruturas eram divididas, originavam-se novos 'protocormos', quando não divididas, desenvolviam-se novas plântulas.

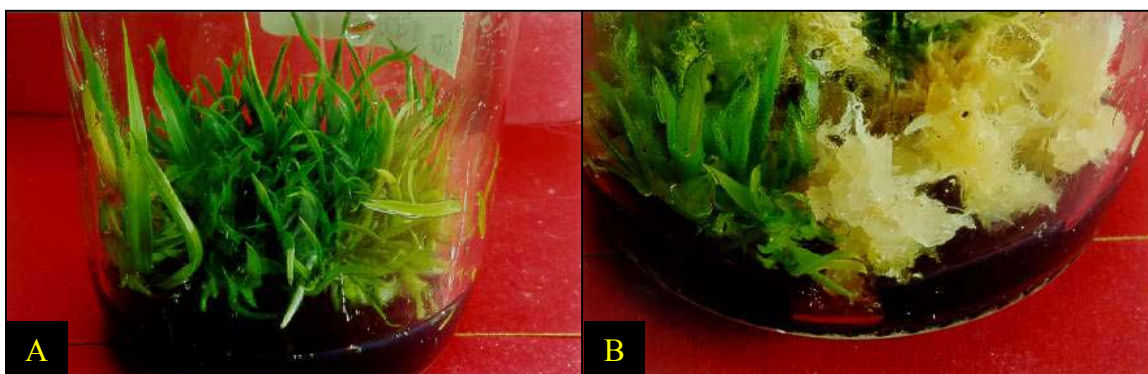


Figura 2 - Desenvolvimento de plântulas (A) e formação de novos calos (B), após 138 dias de cultivo em meio MS.

De acordo com George (1993.a), é possível iniciar cultura de calos morfogeneticamente competentes de explantes derivados de muitos tipos de tecidos. Entretanto, em monocotiledôneas, são restritos os órgãos adequados. Embriões, tecido foliar juvenil, segmento nodal e inflorescências imaturas são os mais comuns. Geralmente, o crescimento destes explantes é iniciado em meio semi-sólido, em presença de altas concentrações de auxina, com ou sem citocinina. Estes explantes podem ser subdivididos ou formar parte área. Quando submetidos a repetidos subcultivos, sua capacidade organogênica pode ser perdida.

Neste trabalho, o meio de cultivo utilizado para germinação das sementes não continha fitorreguladores que justificassem o processo de calogênese. Na literatura revisada não é mencionada a relação de altas temperaturas com a formação de calos durante a germinação de sementes *in vitro* de orquídeas. Pierik (1990) apenas cita que, de forma geral, elevadas temperaturas (22-28 °C) são vantajosas para a formação de calos.

Foi relatado por Stimart *et al.* (1983), citados por George (1993), que altas temperaturas (30 °C) em cultivo *in vitro* de escamas de bulbos de *Lilium longiflorum* têm sido importantes para formação de bulbilhos, os quais produzem folhas quando transplantados, recebendo ou não um novo tratamento térmico (imersão dos bulbilhos em água a 45 °C por uma hora).

Embora a luz seja essencial para o crescimento e desenvolvimento normal de partes aéreas e plântulas, o crescimento de calos em algumas espécies ocorreu somente no escuro. Em outras espécies, a luz é necessária apenas para a iniciação do processo calogênico. Apenas calo pode ser obtido quando subcultivado e mantido no escuro (George 1993). Como pode ser observado, quando os calos foram subcultivados e incubados por 58 dias no escuro, houve formação de novos calos desprovidos de pigmentos, mas que retomaram seu processo normal e desenvolveram-se em plântulas quando transferidos para ambiente com luz.

Algumas culturas de calos têm sido mantidas por muitos anos, não obstante a cultura não é necessariamente estável. Pequenas alterações nas condições de incubação, como período dos ciclos de subcultivo ou temperatura podem afetar a cultura, pois suas células não são homogêneas, acarretando, às vezes, mutações somáticas (Collin & Edwards, 1998).

Futuros estudos deverão ser conduzidos para explicar o efeito de alta temperatura na germinação e no processo calogênico, bem como estudos anatômicos para definir melhor o tipo de estruturas formadas, se são apenas calos ou protocormóides.

Conclusão

As sementes germinadas *in vitro*, após submetidas a altas temperaturas, formaram calos que, aparentemente, podem ser embriogênicos, uma vez que quando recultivados e, ou, subcultivados dão origem a novos calos e plântulas.

Estudos futuros devem ser conduzidos para melhor explicar o efeito de altas temperaturas no processo de germinação e calogênese em orquídeas.

Organogênese *in vitro* a partir de gemas axilares de plantas adultas de *Cattleya loddigesii* x LC Drumbeat ‘San Gabriel’ e de *Cattleya* White Dream

Resumo

O cultivo *in vitro* de gemas axilares é importante para uma rápida e eficiente propagação clonal, por manter a uniformidade, estabilidade e identidade genotípica. O objetivo foi determinar a capacidade morfogênica de gemas axilares dos híbridos *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel' e *Cattleya* White Dream, bem como avaliar a eficiência do método usado para desinfestação. Gemas axilares (1-3 mm²) foram retiradas de pseudobulbos de plantas adultas, que continham as inflorescência, após prévia desinfestação rigorosa. Estes explantes foram inoculados em meio de cultivo líquido com a formulação de Murashige & Skoog (1962), modificada, contendo 0,2 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Após 73 dias e já com formação de estruturas, os explantes foram transferidos para o meio de cultivo constituído de minerais nutrientes de MS, porém sólido, com carvão ativado e sem hormônio. Os tratamentos foram os dois tipos de explantes: 8 gemas axilares do híbrido *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel' e 20 gemas axilares do híbrido C. White Dream. Avaliaram-se a porcentagem de contaminação e o aspecto fisiológico dos explantes, o crescimento e desenvolvimento destes. Apenas as gemas do híbrido C. White Dream apresentaram contaminação (25 %), considerada baixa. Em C. *loddigesii* x LC. Drumbeat 'San Gabriel' observaram-se 87,5 % de explantes oxidados e em C. White Dream, 75 %, aos 73 dias de cultivo. Após três meses, em meio sólido sem regulador de crescimento, 37,5 % de C. *loddigesii* x CL. Drumbeat 'San Gabriel' e 39,2 % de C. White Dream formaram calos, embora se apresentando oxidados. Dentre as gemas do híbrido C. White Dream, 12,5 % formaram calos e partes aéreas e, na mesma proporção, parte aérea e raízes. Embora os explantes apresentassem alta porcentagem de oxidação, todos mostraram boa capacidade morfogênica, principalmente as gemas axilares do híbrido C. White Dream, potencializando uma via real para propagação em escala comercial desse híbrido.

Palavras-chave: orquídeas, cultivo *in vitro*, morfogênese.

Introdução

As espécies e os híbridos do grupo *Cattleya* dão origem a flores com grande valor econômico e ornamental (Arditti & Ernst, 1992), sendo, portanto, primordial para que o produtor obtenha explantes de plantas adultas, em franca capacidade de floração, para certificar-se de que é exatamente aquela planta que deverá ser propagada em grande escala, obtendo nos descendentes as mesmas características da planta-matriz.

Embora explantes possam ser obtidos de distintas partes da planta, as gemas axilares e ápices caulinares são os tipos de explantes mais utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas, pois são tecidos juvenis que possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais irão se desenvolver em plantas (Pierik, 1990). Além disso, apresentam as vantagens de possibilitar a limpeza clonal, a conservação e o intercâmbio de germoplasma, segundo Prakash *et al.* (1995), mantendo a uniformidade, estabilidade e identidade genotípicas (Pierik, 1990).

Por ser o explante extraído de plantas adultas geralmente mantidas em casa de vegetação, um método eficiente de desinfestação é de fundamental importância, referente tanto à planta-matriz como ao explante, para se lograr êxito na propagação *in vitro*, assegurando o cultivo axênico (George, 1993).

Segundo Pierik (1990), diversas substâncias químicas podem ser utilizadas para desinfestação. Entre estas, para material vegetal, recomenda-se o álcool etílico, sendo 70 % (v/v) a solução que possui maior poder germicida, eliminando a tensão superficial do explante e dissolvendo, em alguns casos, as camadas epicuticulares. O álcool 96 % tem seu uso desaconselhado na desinfestação, por desidratar demasiadamente os tecidos vegetais. Seu uso restringe-se apenas à esterilização (flambagem) dos instrumentos cirúrgicos. Geralmente, o hipoclorito de sódio é utilizado com concentração que varia de 1,0 % a 2,0 % (v/v). Em tecidos mais sensíveis, o hipoclorito de cálcio, em concentrações entre 3,5 e 10 % (v/v), constitui uma alternativa de desinfestação. O tempo da desinfestação e a concentração do agente

desinfestante vão depender das circunstâncias particulares de cada caso, devendo ser previamente testados, quando não se conhecem métodos eficientes para a planta-alvo de estudo.

Explantos aparentemente livres externamente de microrganismos podem, entretanto, apresentar contaminação interna, que se torna visível apenas depois de um período de contato com o meio de cultivo. Em alguns casos, após vários recultivos (Leifert *et al.*, 1994).

As contaminações internas em plantas devem-se, geralmente, a bacilos (principalmente *Bacillus licheniformis* e, ou, *Bacillus subtilis*), os quais têm sido denominados fantasmas brancos (white ghosts) nos Estados Unidos. Estas bactérias saprofíticas caracterizam-se pela formação de esporos capazes de tolerar condições consideradas desfavoráveis, como calor, deficiência hídrica, frio, radiação ultravioleta e agentes químicos desinfestantes (Pierik, 1990). Segundo esse autor, o uso de antibióticos adicionados ao meio de cultivo não tem ocasionado resultados efetivos. Geralmente, são utilizados em elevadas concentrações, que inibem o crescimento e desenvolvimento das plantas. Podendo conduzir a seleção de microrganismos resistentes.

Atualmente, muitos laboratórios de cultura de células e tecidos vegetais têm empregado substâncias detergentes para atender a desinfestações específicas. Vale ressaltar que dada a sensibilidade dos tecidos vegetais aos desinfestantes até então utilizados, foi desenvolvido, nos Estados Unidos, o produto PPM (Plant Preservative Mixture - TM®). Este produto tem sido uma nova alternativa ao uso de antibióticos e fungicidas convencionais em cultura de tecido, por ser de amplo espectro de ação preventiva e biocida (George & Tripepi, 2001).

Uma vez que, para cada genótipo é necessário um protocolo específico para sua propagação *in vitro*, este trabalho objetivou avaliar a eficiência do método usado para a desinfestação e determinar a capacidade morfogênica *in vitro* de gemas axilares dianteiras dos híbridos de *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat ‘San Gabriel’ e *C. White Dream*.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Origem e tipo de explantes

Os explantes foram extraídos de plantas adultas dos híbridos *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel' e *Cattleya* White Dream, cultivados em casa de vegetação.

Foram utilizadas, como explantes, gemas axilares dianteiras, procedentes da base de pseudobulbos, os quais apresentavam inflorescência. As gemas foram extraídas com aproximadamente 1 a 3 mm² de área da base.

2. Desinfestação e preparação dos explantes

As bases dos pseudobulbos retiradas das plantas-matrizes, contendo as gemas, inicialmente foram tratadas com solução de detergente neutro para laboratório 50 % v/v (Vetec[®]) por 5 minutos, seguido da enxaguadura com água desionizada e autoclavada, até a retirada de todo detergente. Em seguida, tratadas com álcool 70 % v/v, por 5 minutos. Posteriormente, sob condições de câmara de fluxo laminar, as bases dos pseudobulbos foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2 % v/v (água sanitária comercial pura), por 20 minutos, seguido de quatro enxaguaduras sucessivas com água desionizada estéril, no primeiro tempo de 5 minutos e demais com 10 minutos. Durante todo o processo de desinfestação, os frascos que continham o material a ser imerso nas soluções desinfestantes e também na água foram agitados manualmente, em intervalos regulares de tempo.

Ainda sob condições de câmara de fluxo laminar, retiraram-se as gemas da base dos pseudobulbos, mergulhando-as em álcool 70 % e em hipoclorito de sódio 0,2 % v/v (água sanitária comercial) e, posteriormente, as folhas mais externas foram retiradas mediante o uso de pinça e bisturi de aço inoxidável.

Este processo foi realizado em placa de petri, estando as gemas imersas em água desionizada estéril, para evitar a oxidação e a desidratação dos explantes. Os explantes, após preparados, foram imersos sucessivamente, por alguns segundos, em hipoclorito de sódio 0,2 % v/v (água sanitária comercial) e diretamente inoculados no meio de cultivo.

3. Fase morfogênica

3.1. Composição, preparação do meio e inoculação dos explantes no meio de cultura

Com vistas ao processo morfogênico, os explantes foram cultivados em um meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), com 1/5 da concentração do componente ferro. O meio de cultivo continha ainda 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0,2 mg L⁻¹ de cinetina, 1,0 mg L⁻¹ de ácido alfa-naftalenoacético (ANA), 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 8 g L⁻¹ de agar (Isotarma®).

O meio de cultivo teve o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, sendo posteriormente distribuídas alíquotas de 10 mL deste meio em tubos de ensaio, com dimensões de 25 x 150 mm e previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 30 minutos. Após a distribuição do meio, os tubos de ensaios foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C, pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os explantes, um em cada tubo de ensaio, foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os tubos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

3.2. Período e condições de incubação

Os tubos de ensaio foram distribuídos aleatoriamente em uma grade própria, colocados em estantes na sala de cultivo, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo durante 16 dias no escuro.

Após este período, foram transferidos para um ambiente com luz, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro) e irradiância de $68 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W), mantidas as demais condições. Os explantes permaneceram incubados por 73 dias, quando se verificaram o intumescimento dos explantes e o início de desenvolvimento das gemas.

3.3. Características avaliadas e análise estatística

Para analisar a capacidade morfogênica das gemas axilares desses híbridos, avaliaram-se, a partir de cada explante, o estado fisiológico aparente, no referente à coloração, aos sete e 73 dias de cultivo, e também à área dos explantes, após o início do crescimento, mediante o uso de papel milimetrado, ao final de 73 dias.

Quanto ao método de desinfestação, a contaminação visualmente detectável foi avaliada aos três, 25 e 73 dias de cultivo.

O experimento foi montado segundo delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamento dois híbridos, com diferentes números de repetição. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio contendo um explante, sendo: a) tratamento 1: gemas axilares do híbrido *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel', com oito repetições; e b) tratamento 2: gemas axilares do híbrido *Cattleya* White Dream, com 20 repetições.

Foi realizada uma análise estatística descritiva dos dados observados.

4. Fase organogênica

Após 73 dias de cultivo, os explantes, já intumescidos e com sinais aparentes de crescimento e desenvolvimento, foram transferidos para um novo meio, com vistas a induzir o processo organogênico.

4.1. Composição, preparação do meio e inoculação dos explantes

Visando ao processo organogênico, os explantes foram cultivados em um meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

O meio de cultivo teve o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição do ágar (Isofarma®), 8 g L⁻¹, previamente fundido em forno microondas. Posteriormente, em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm, esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 30 minutos, foram distribuídos 10 mL de meio de cultivo. Após a distribuição, os tubos contendo o meio foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os explantes, um em cada tubo de ensaio, foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os tubos foram fechados, conforme descrito acima.

4.2. Condições de incubação

Os tubos de ensaio, dispostos em grades de metal, foram colocados em estantes, na sala de cultivo e mantidos a uma temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de 48 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W), por quatro meses.

4.3. Características avaliadas e análise estatística

Para analisar a capacidade organogênica de gemas axilares dos híbridos estudados, quando transferidos para meio sólido sem regulador de crescimento e após três meses de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de sobrevivência dos explantes, o desenvolvimento e a formação de novas

estruturas e, ou, plântulas, bem como a porcentagem de contaminação durante o mesmo período.

O experimento foi montado segundo delineamento inteiramente casualizado, com diferentes números de repetição. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio, contendo um explante, como descrito no item 4.5.

As características foram avaliadas por meio de estatística descritiva.

Resultados e discussão

1. Fase morfogênica

1.1. Porcentagem de contaminação

Em relação ao método de desinfestação utilizado, nos primeiros três dias de cultivo, quando os explantes estavam incubados no escuro, observaram-se três tubos de ensaio contaminados (15 % do total de 20 explantes), cujos explantes procederam do híbrido *Cattleya* White Dream. A contaminação tinha o aspecto de massa branca leitosa ao redor dos explantes, provavelmente, provocada por bactéria. Após 25 dias, quando já incubados sob condições luminosas, foi observado mais um tubo de ensaio contaminado por fungo, totalizando 20 % de contaminação.

Nesta fase, não foi verificada contaminação nos explantes oriundos do híbrido *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel'.

Dos 25 dias até ao final do experimento (aos 73 dias de cultivo), não se observou contaminação aparente adicional em ambos os tratamentos.

Embora 20 % das gemas axilares de *C. White Dream* estivessem contaminadas, pode-se considerar que o método de desinfestação utilizado foi eficiente, uma vez que as gemas axilares do híbrido *C. loddigesii* x *LC Drumbeat* 'San Gabriel' não apresentaram qualquer contaminação. Os dois híbridos demonstraram diferente potencial de contaminação. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), gemas axilares, quando utilizadas como explantes, apresentam maior resistência à desinfestação.

Reinert & Mohr (1967) utilizaram para desinfestar gemas traseiras de rizomas, procedentes de plantas adultas de *Cattleya*, uma solução 0,5 % de cloro comercial, por 10 minutos, seguido por 5 minutos em álcool 70 %, finalizando com solução 8,0 % de hipoclorito de cálcio, por 20 minutos.

Scully (1967) e Kako (1973), citados por Arditti & Ernst (1992), utilizaram para desinfestar gemas laterais de brotações, oriundas de plantas adultas de *Cattleya*, apenas solução de cloro comercial (Clorox®) a 20 % v/v, por 5

minutos. Após a exposição das gemas, as brotações eram desinfestados novamente com mesma solução, por 10 minutos.

Lindemann *et al.*(1970), também citados por Arditti & Ernst (1992), visando ao cultivo de ápices meristemáticos, desinfestaram as brotações axilares livres de folhas senescentes, inicialmente com álcool 95 %, seguido de enxaguadura em água destilada. Posteriormente, deixaram imersos em solução de hipoclorito de cálcio (0,4 a 0,5 % v/v), por 20 a 30 minutos, concluindo com sucessivas enxaguaduras com água destilada estéril.

Vajrabhaya (1978), citado por Arditti & Ernst (1992), utilizando como explantes gemas dormentes de pseudobulbos traseiros, lavou, primeiramente, os pseudobulbos e rizomas em água corrente, desinfestando-os, a seguir, em solução de cloro comercial (Clorox[®]) 10,0 % v/v, submergindo-os por 15 a 30 minutos. Posteriormente, foram removidos os primórdios foliares das gemas, submetendo-as, novamente, a outra solução de cloro comercial 5,0 % v/v, por aproximadamente uma hora, não se verificando danos aos tecidos. Logo após, mais primórdios foliares são removidos, de modo a expor os pontos de crescimento. De novo, os tecidos são imersos por alguns segundos em solução de cloro 0,1 % v/v.

É digno de nota mencionar que nenhum destes trabalhos relata problemas com microrganismos ou refere-se à porcentagem de contaminação.

1.2. Estado fisiológico dos explantes

O estado fisiológico dos explantes foi avaliado visualmente no sétimo dia de cultivo, quando estavam ainda incubados no escuro.

Dentre os oito explantes procedentes do híbrido *C. loddigesii* x *LC*. Drumbeat ‘San Gabriel’, dois deles apresentavam-se completamente oxidados, e seis, mostravam coloração variando de verde claro a amarelo, dentre os quais, notaram-se dois explantes aparentemente intumescidos.

Também aos sete dias de cultivo, dos 20 explantes oriundos do híbrido *C. White Dream*, cinco destes apresentavam-se oxidados nas extremidades e os restantes com coloração variando de verde claro a amarelo, inclusive os explantes contaminados.

Aos 73 dias de cultivo, 87,5 % dos explantes do híbrido *C. loddigesii* x *LC. Drumbeat* 'San Gabriel' e 75 % dos explantes de *C. White Dream* mostraram-se completamente oxidados, considerando, como mencionado no item 1.1, que, nesta fase do cultivo, os tubos contaminados já haviam sido eliminados (Quadro 1).

A alta porcentagem de oxidação em ambos tipos de explantes pode ser explicada, provavelmente, pela sensibilidade dos tecidos aos agentes desinfestantes, bem como pelo tamanho inicial do explante. Como citado por Grattapaglia & Machado (1998), ápices muito pequenos, como para isolamento de meristemas, são freqüentemente tenros e susceptíveis aos agentes desinfestantes.

1.3. Área dos explantes

Quando os explantes apresentaram os primeiros sinais de crescimento e desenvolvimento e imediatamente antes de serem transferidos para outro meio de cultivo, mediu-se a sua área, visando estimar o crescimento alcançado (Quadro 1).

Neste trabalho, os explantes, em geral, aumentaram sua área até próximo aos dois meses (53 dias de cultivo). Nesse período, a área inicial dos explantes, de 1 a 3 mm², foi aumentada 16 vezes. Posteriormente, observou-se que os explantes oxidados cessaram o crescimento e apenas alguns continuaram o desenvolvimento na fase organogênica.

Vajrabhaya (1978), citado por Arditti, relatou o crescimento e desenvolvimento das gemas dormentes de pseudobulbos utilizados como explantes para propagação *in vitro* de *Cattleya*. Ao longo de duas semanas de cultivo, os explantes permaneceram verdes. Estes cresceram lentamente durante os primeiros dois meses e o diâmetro aumentou apenas duas a três vezes. O crescimento pode ser mais rápido após este período, com eventual formação de protocormóides, que, neste caso, desenvolveram-se em plântulas.

Quadro 1 - Área e aspectos dos explantes extraídos de gemas axilares da base dos pseudobulbos dos híbridos *C. loddigesii* x *LC. Drumbeat* 'San Gabriel' (Trat. 1) e *C. White Dream* (Trat. 2), na fase morfogênica, aos 73 dias de cultivo

Rep.	Trat 1	Aspecto (Trat. 1)	Trat. 2	Aspecto (Trat. 2)
	mm ²		(mm ²)	
1	7 x 4	Verde	3 x 5	Oxidado
2	6 x 4	Oxidado	2 x 3	Oxidado
3	5 x 5	Oxidado	4 x 6	Oxidado
4	1 x 1	Oxidado	3 x 3	Oxidado
5	3 x 8	Oxidado	3 x 5	Oxidado
6	4 x 6	Oxidado	3 x 6	Oxidado
7	1 x 7	Oxidado	2 x 4	Oxidado
8	2 x 4	Oxidado	3 x 5	Oxidado
9	-	-	3 x 5	Oxidado
10	-	-	3 x 4	Oxidado
11	-	-	3 x 6	Verde oxidado*
12	-	-	3 x 6	Verde oxidado*
13	-	-	6 x 8	Verde
14	-	-	5 x 7	Verde oxidado*
15	-	-	2 x 4	Oxidado
16	-	-	6 x 8	Oxidado

* Verde oxidado = explante verde com extremidade oxidada.

2. Fase organogênica

Esta segunda fase do experimento, conduzida em meio de cultivo sólido sem reguladores de crescimento, foi avaliada com três meses de cultivo.

2.1. Porcentagem de sobrevivência e desenvolvimento dos explantes

Os explantes (gemas dianteiras) do híbrido *C. loddigesii* x *LC. Drumbeat* 'San Gabriel', em 37,5 % do total de oito explantes, mesmo oxidados,

apresentaram formação de calos, de coloração esverdeada. Os demais mostraram-se completamente oxidados, sem resposta organogênica.

As gemas dianteiras do híbrido *C. White Dream* apresentaram os melhores resultados de sobrevivência e desenvolvimento. Do total de 16 explantes, 68,8 % estavam completamente oxidados e 6,2 % dos explantes, mesmo estando oxidados, formaram calos de coloração verde. Melhores respostas organogênicas foram observadas em 12,5 % dos explantes que, embora oxidados, formaram calos de coloração verde e algumas estruturas de parte aérea. Em igual proporção (12,5 %), os demais explantes formaram calos de coloração verde, partes aéreas e raízes (Figura 1).



Figura 1 - Formação de calos de coloração verde, partes aéreas e raízes em explantes do híbrido *Cattleya White Dream*, após três meses de cultivo em meio MS sólido, sem fitorregulador.

Vajrabhaya (1978), citado por Arditti & Ernst (1992), utilizando como explantes gemas dormentes de pseudobulbos traseiros de *Cattleya*, logrou êxito na formação de protocormóides e subsequente desenvolvimento destes em plântulas. Utilizou o meio de cultivo constituído de minerais nutrientes de Knudson C (1946) modificado, contendo apenas 2,4-D ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) como fitorregulador. Este mesmo autor menciona que estes tipos de explantes crescem mais lentamente em relação aos obtidos de brotações, embora desenvolvam-se similarmente.

Não foram encontrados na literatura consultada trabalhos em que fossem utilizadas gemas dianteiras de pseudobulbos com inflorescências. Não

obstante, estas gemas dianteiras geralmente brotarem, após o florescimento, sendo, ademais, um estágio mais juvenil, se comparado às gemas das brotações em estágio de crescimento intermediário (3 a 9 cm), já testadas exaustivamente, com bons resultados. Assim, a partir de gemas dianteiras de pseudobulbos, apresentando estágio de crescimento mais novo, é possível obter melhores respostas organogênicas, já que as células estão em ativo processo de divisão e, ainda, não diferenciadas.

Futuros trabalhos deverão ser realizados para comparar gemas de brotações em vários estágios de crescimento.

2.2. Porcentagem de contaminação

Durante os três meses de cultivo da fase organogênica, não foi observada contaminação dos explantes.

Nesta fase, procurou-se evitar a contaminação por meio de controles operacionais, por exemplo, assepsia na câmara de fluxo durante recultivos, experiência prática e zelo do operador, bem como assepsia da sala de cultivo, como mencionado por Pierik (1990).

Conclusão

Embora os explantes apresentassem alta porcentagem de oxidação, tanto as gemas do híbrido de *Cattleya loddigesii* x *Laeliocattleya* Drumbeat 'San Gabriel' quanto as do híbrido *Cattleya* White Dream mostraram elevado potencial morfogênico, tornando-se via promissora para a propagação em escala comercial destas orquídeas.

O método usado para a desinfestação mostrou-se eficiente na redução do número de explantes contaminados. Todavia, estudos futuros serão necessários para simplificá-lo, ajustar o binômio tempo de imersão e concentração dos agentes desinfestantes, de modo a evitar danos aos explantes.

**Morfogênese *in vitro* a partir de gemas axilares de
plântulas juvenis provenientes de sementes de
Brassolaeliocattleya Sun King ‘Orange’ x *Laelia*
*purpurata***

Resumo

Algumas espécies da família Orchidaceae, como as do gênero *Cattleya*, possuem elevada importância econômica no mercado florístico, que está em plena expansão. Portanto, é importante dispor de métodos adequados de propagação massal, como a cultura de tecidos. Objetivou-se, no entanto, avaliar a capacidade organogênica de gemas axilares de plântulas do grupo *Cattleya* e estabelecer um meio de cultivo eficiente. Plântulas do cruzamento de *Brassolaeliocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia crispa*, obtidas por via seminífera, foram inoculadas em meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), após a remoção das raízes e 2/3 das folhas. Os tratamentos foram a combinação das concentrações (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2 mg L⁻¹) do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg L⁻¹) de benzilaminopurina (BAP) e os tempos de cultivo (20, 40 e 60 dias). O experimento foi montado em um esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas, as concentrações de 2,4-D e BAP, com um fatorial 5 x 5, e as subparcelas, os tempos de cultivo, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram analisados segundo a metodologia da superfície de resposta. Foram avaliados a matéria fresca, o comprimento e o número de estruturas por explante. O 2,4-D não teve influência sobre a matéria fresca e o número de estruturas. Para a matéria fresca, a melhor concentração de BAP foi 1,28 mg L⁻¹ para 60 dias de cultivo. Para o número de estruturas, 1,20 mg L⁻¹ de BAP em 47 dias de cultivo foi o melhor tratamento. Para o comprimento, as concentrações de 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,25 mg L⁻¹ de BAP, no tempo de 60 dias, deram melhores respostas. Conclui-se que os explantes desse híbrido respondem aos reguladores de crescimento, mais efetivamente, quando cultivados em meio líquido contendo 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,24 mg L⁻¹ de BAP, possibilitando a formação de plântulas deste híbrido, em um tempo variável entre 40 e 60 dias.

Palavras-chave: organogênese, *Cattleya*, orquídea.

Introdução

As espécies e os híbridos de orquídeas possuem elevada importância econômica, principalmente como plantas ornamentais, dadas a beleza e exuberância de suas flores (Arditti & Ernst, 1992), com destaque para o grupo *Cattleya*, que engloba os gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronites* e *Brassavola* (Sheehan, 1992). Estes gêneros são inter cruzados formando híbridos que apresentam flores com excelentes características florais (Black, 1973).

O Brasil apresenta grande potencial no que se refere à gestão em agronegócios em floricultura, devido à diversidade climática, multiplicidade de espécies e variedades, além de um amplo mercado em expansão, o que exige o desenvolvimento e a aplicação de alta tecnologia, produção em grande escala e exploração de novos híbridos e variedades (Castro, 1998). Todos estes aspectos ratificam a importância da exploração comercial das orquídeas, principalmente aquelas do grupo *Cattleya*, uma vez que muitas espécies são autóctones do Brasil (Suttleworth, 1997).

Para satisfazer às necessidades de mercado é, portanto, importante dispor de métodos adequados de propagação de orquídeas em grande escala, produzindo rapidamente plantas homogêneas, com as mesmas características da planta-matriz (muitas vezes híbridos com características perfeitas de forma, textura, substância e coloração da flor). Para isso, tem havido interesse constante em utilizar as técnicas de cultura de tecido (Mauro *et al.*, 1994).

Várias pesquisas têm revisado as estratégias apropriadas para o desenvolvimento de sistemas de propagação *in vitro* de orquídeas, pois o tempo requerido para tal é muito variável, pois vai depender do tipo de explante, meio de cultivo e dos genótipos (Prakash *et al.*, 1996).

Os explantes juvenis permitem pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores, sendo um tipo modelar de explante para se testarem meios de cultivo e condições ambientais de cultura. Explantes de plântulas germinadas e crescidas *in vitro* apresentam essa grande vantagem de possuir tecidos juvenis e disponibilizar material sem

contaminação. A variabilidade de genótipos e as diferenças fisiológicas entre os tecidos de uma plântula e de um meristema isolado de tecido não juvenil limitam, contudo, a eficiência desta estratégia (Grattapaglia & Machado, 1998).

Champagnat et al. (1970), citados por Arditti & Ernst (1992), utilizaram gemas axilares da base de folhas de *Cattleya* para produzir protocormóides e, a partir destes, lograram a produção de brotações adventícias. É um método simples e efetivo. Entretanto, desde que os tecidos a serem cultivados sejam obtidos de plântulas, o procedimento não pode ser usado para a propagação de clones estabelecidos. Recomendado sua utilização em casos em que somente poucas plântulas podem ser obtidas por cruzamento ou por cultivo de ápices meristemáticos.

Muitos esforços têm sido direcionados para modificar o meio de cultivo, principalmente pela inclusão de fitorreguladores, levando em consideração as variações genéticas que podem ocorrer nas plantas cultivadas *in vitro*, devido às altas concentrações destes e o período de cultivo (Prakash, 1996).

A descoberta clássica de Skoog & Tsui (1948) e Skoog & Miller (1957) sobre os processos de morfogênese, em que eles relacionam o mecanismo básico de regulação do desenvolvimento nas plantas com a interação entre auxina e citocinina, demonstra a importância de estabelecer um meio de cultivo com concentrações adequadas de reguladores de crescimento para otimizar a propagação de orquídeas de interesse econômico. Uma relação alta de auxina/citocinina proporciona o desenvolvimento do sistema radicular; em contrapartida, uma relação baixa, induz a formação de parte aérea (Skoog & Miller, 1957).

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade morfogênica a partir de segmentos de plântulas obtidas pela via seminífera *in vitro* e estabelecer um meio de cultivo eficiente, utilizando concentrações variadas de auxina e citocinina.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Condições do processo de morfogênese

1.1. Tipo e preparação dos explantes

Os explantes procederam de plântulas do híbrido *Brassolaeliocattleya* Sun King 'Orange' x *Laelia purpurata*, com nove meses de idade, obtidas pela via seminífera *in vitro*, germinadas e mantidas em meio de cultivo constituído dos minerais nutrientes de Knudson C, quando as plântulas apresentando o tamanho de 1 a 3 cm de comprimento foram utilizadas para a extração dos explantes usados na condução deste experimento (Figura 1A).

De cada plântula, retiraram-se as raízes e os 2/3 superiores do limbo de cada folha, restando a base foliar e as gemas axilares e apical com aproximadamente 8,0 mm de comprimento, que foram utilizadas como explante (Figura 1B).

1.2. Composição, preparação e esterilização do meio de cultivo e inoculação dos explantes

O meio utilizado para cultivo dos explantes constituiu-se dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), com a adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ mioinositol e 50 mL L⁻¹ de água de coco natural. A este meio basal foram adicionadas, em combinação, diferentes concentrações de BAP (benzilaminopurina): 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg L⁻¹ e de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético): 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2 mg L⁻¹.

Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, sendo posteriormente distribuídos 20 mL de cada meio em frascos erlenmeyer com capacidade volumétrica de 50 mL, previamente esterilizados em autoclave a

121 °C, pressão de 1,05 kg.cm⁻², durante 30 minutos. Após a distribuição dos meios, os frascos erlenmeyers foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e papel alumínio.

Os frascos, contendo os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C, pressão de 1,05 kg.cm⁻², durante 20 minutos.

Após a esterilização, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente. Cada frasco recebeu cinco explantes.

Depois da inoculação dos explantes, os frascos foram fechados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e envolvidos totalmente com papel alumínio, para proteção contra luz.

1.3. Condições de cultivo

Inicialmente, na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, os frascos contendo os explantes foram incubados no escuro por um período de 10 dias, sob agitação de 60 rpm em agitador orbital. Posteriormente, foram transferidos, nesta mesma sala, para condição de fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de 42 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W), e mantidos sob iguais condições de agitação. Nestas condições, os explantes permaneceram por mais 50 dias (Figuras 1C e 1D). Durante os 60 dias de incubação dos explantes, o meio de cultivo não foi trocado.

1.4. Características avaliadas

Para analisar a capacidade morfogênica dos distintos explantes, sob condições de câmara de fluxo laminar, avaliaram-se, a partir de cada explante, as seguintes características:

- a) produção de matéria fresca (mg), em balança analítica;
- b) comprimento (mm), por meio de papel milimetrado;
- c) coloração dos explantes referentes ao estado de oxidação;

- d) coloração do meio de cultivo, por meio de uma escala diagramática na qual se estabeleceram notas de 1 a 5, sendo a nota 1 correspondente ao meio sem qualquer alteração, notas de 2 a 4, a colorações de tonalidades crescentes de róseo, e a nota 5, ao meio de coloração amarelada; e
- e) número de estruturas (protocormóides + calo + gemas) formadas na base dos explantes.

1.5. Análise estatística

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas, tendo na parcela um esquema fatorial 5 x 5 (concentrações de BAP e 2,4-D) e nas subparcelas os tempos de cultivo (20, 40 e 60 dias) no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os dados foram interpretados utilizando-se a técnica da superfície de resposta e os modelos escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, ao nível de 1 % para o coeficiente de determinação ($R^2 = \text{SQ Regressão} / \text{SQ Tratamento}$) e no fenômeno em estudo.

2. Condições do processo de organogênese

Após a avaliação aos 60 dias de cultivo, os explantes primários e as novas estruturas e separadas espontaneamente daqueles explantes foram transferidos para o meio MS sólido. O objetivo foi avaliar o comportamento do processo morfogênico numa nova condição de meio de cultivo e a possível formação de plantas.

2.1. Composição e preparação do meio de cultivo e inoculação dos explantes

O meio de cultivo utilizado constituiu-se dos minerais nutrientes de MS (Murashige e Skoog, 1962), com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

Este meio de cultivo teve o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 8 g L^{-1} de ágar (Isofarma[®]), previamente fundido em forno microondas. Posteriormente, o meio foi distribuído em frascos de cultivo previamente esterilizados em autoclave a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 30 minutos.

Foram utilizados frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm, contendo cerca de 40 mL de meio de cultivo. Estes foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

A esterilização do meio de cultivo deu-se em autoclave a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de $1,05 \text{ kg.cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

2.2. Condições de cultivo

Sob condição de câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados no meio de cultivo, de tal maneira que os explantes primários ficassem na periferia dos frascos, afastados a mais ou menos 1,0 cm da parede destes, e as estruturas formadas e espontaneamente destacadas ficassem distribuídas equidistantemente na parte central dos referidos frascos. Após a inoculação dos explantes, os frascos de cultivo foram fechados com tampa de polipropileno transparente e suas bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac[®]).

Na sala de cultivo, os frascos foram dispostos em estantes, a uma distância aproximada de 5 cm uns dos outros, e mantidos a uma temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $42 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W)(Figura 1E).

2.3. Características avaliadas

Para analisar a resposta organogênica dos distintos explantes e das novas estruturas formadas, realizou-se uma avaliação visual descrevendo o estado de oxidação e o seu desenvolvimento.

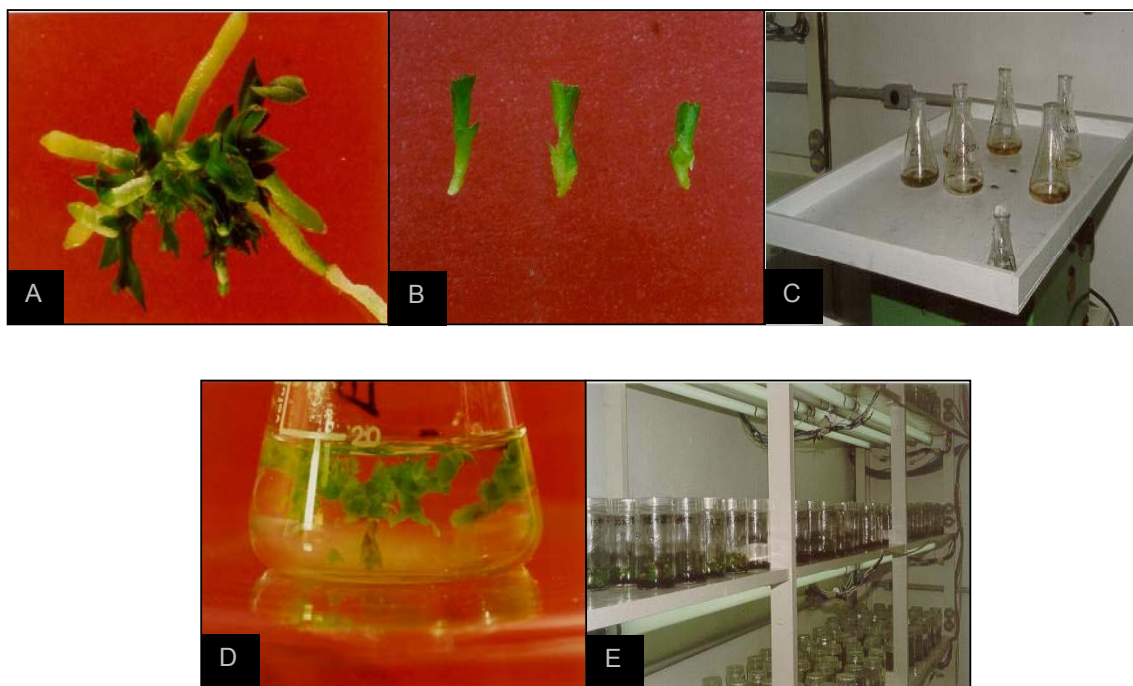


Figura 1 - (A) Plântulas com nove meses de idade, obtidas pela via seminífera *in vitro*, utilizadas como fonte de explantes; (B) aspectos dos explantes já preparados para a utilização na montagem do experimento; (C) modelo do shaker horizontal, na sala de cultivo; (D) explantes primários e a neoformação de estruturas em meio líquido MS (Murashige & Skoog); e (E) frascos contendo os explantes primários e novas estruturas formadas em meio sólido MS, na sala de cultivo.

Resultados e discussão

1. Processo de morfogênese

1. Matéria fresca

O crescimento e desenvolvimento, avaliados pela produção média de matéria fresca por explante (MAF), foram influenciados apenas pela presença de BAP e pela duração do período de incubação ou tempo de cultivo (T), mais bem explicados pelo modelo $M\hat{A}F = -189,351 + 8,064^{**} T + 332,405^{**} BAP - 129,629^{**} BAP^2$. O 2,4-D não afetou esta variável, ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste t.

Quando foi analisado o incremento em matéria fresca, fixando as concentrações de BAP (Figura 2), observou-se que a resposta morfogênica dos explantes aumentou linearmente com o período de incubação, ou seja, quanto maior o tempo de cultivo, maior produção de matéria fresca. Fixando o tempo de cultivo e variando as concentrações de BAP (Figura 3), verificou-se um comportamento quadrático. A produção foi máxima, quando se adicionou ao meio de cultivo $1,28 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

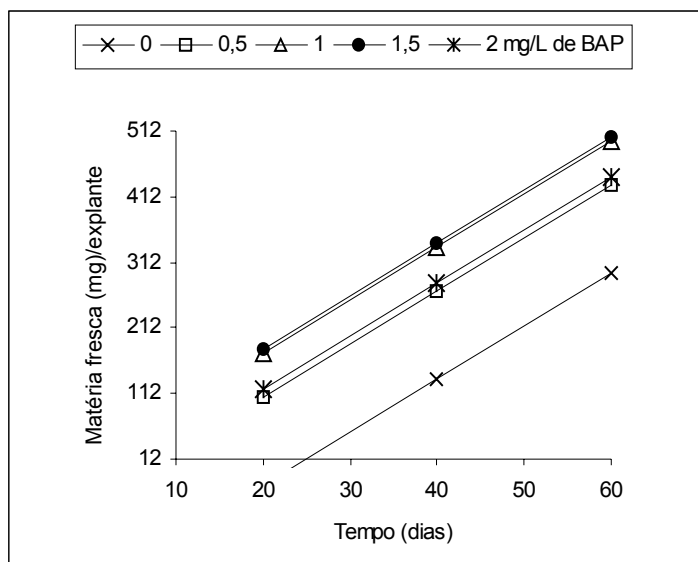


Figura 2 - Estimativas da produção de matéria fresca (mg) por explante, em função dos intervalos de tempo para respectivas concentrações de BAP.

Para a concentração de BAP, considerada ideal ($1,28 \text{ mg L}^{-1}$), os valores observados para a máxima produção de matéria fresca, nos tempos de 20, 40 e 60 dias, foram 185; 346; e 508 mg, respectivamente. Isto corresponde a um acréscimo de 87,0 % no valor médio da matéria fresca dos explantes no intervalo entre 20 e 40 dias e 46,8 % no intervalo entre 40 e 60 dias de cultivo. Esta tendência ocorreu provavelmente em resposta à redução na disponibilidade dos nutrientes e um provável acúmulo de substâncias tóxicas, uma vez que não foi feita a renovação do meio de cultivo.

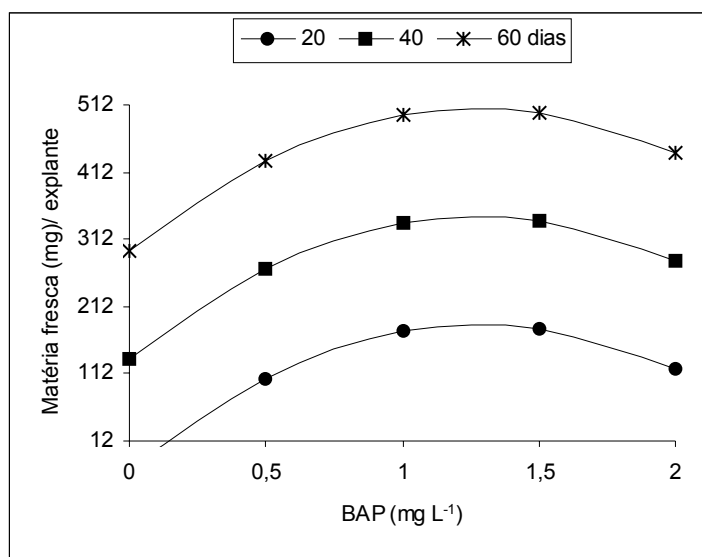


Figura 3 - Estimativas da produção de matéria fresca (mg) por explante, em função das diferentes concentrações de BAP nos respectivos intervalos de tempo.

Pierik & Steegmans (1972), estudando o efeito do BAP no crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya aurantiaca* Rolf, utilizando como explante uma plântula com pequeno protocormóide e duas pequenas folhas, concluíram que altas concentrações de BAP (10 mg L^{-1}) proporcionavam máxima produção de matéria fresca (1530 mg).

Mauro *et al.* (1994) estudaram a influência de BAP e de ANA, em concentração de 0; 0,1; 1,0; e 10 mg L^{-1} , para a produção de biomassa. Utilizaram como explantes plântulas de *Cattleya aurantiaca* Rolf, sem raízes e com as folhas cortadas, de modo que o comprimento fosse de 2 a 4 mm.

Concluíram que para a matéria fresca, a maior média foi obtida quando se adicionaram ao meio de cultivo 10,0 mg L⁻¹ de ANA.

Neste trabalho, com uma concentração aproximadamente nove vezes menor desta mesma citocinina utilizada pelos autores citados, alcançaram-se melhores resultados, embora sejam distintos os genótipos.

Carvalho (2002) utilizou como explantes plântulas das quais foram retiradas as raízes e os 2/3 do limbo superior de cada folha, oriundos do híbrido *Cattleya walkeriana* 'Estrela Dalva' x *C. walkeriana* 'Coerulea', submetidos ao mesmo método deste trabalho, utilizando-se BAP e 2,4-D. Logrou-se melhor resultado de produção de matéria fresca, quando foram adicionados ao meio de cultivo 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,15 mg L⁻¹ de BAP. Diferente deste trabalho, em que somente a concentração de BAP influenciou nos resultados de matéria fresca, com uma concentração ótima semelhante, 1,28 mg L⁻¹.

1.2. Comprimento

Em relação ao comprimento (COM), o modelo estatístico que explicou o fenômeno relacionou duração do tempo (T) de cultivo e concentrações de 2,4-D (D) e BAP (B). É representado pela equação $C\hat{O}M = 7,66333 + 0,10405^{**} T + 4,55527^{**} D - 3,85717^{**} D^2 + 5,19552^{**} B - 2,08476^{**} B^2$, ($R^2 = 0,7547$)

Aos 20 dias de cultivo (Figura 4A), observou-se que o acréscimo no comprimento dos explantes convergia para um intervalo de combinações dos fitorreguladores, apresentando comportamento quadrático. O mesmo comportamento foi notado nos outros dois tempos de cultivo, 40 e 60 dias (Figuras 4, B e C).

Os pontos de máximo comprimento foram obtidos para as combinações de 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,25 mg L⁻¹ de BAP, com os valores de 14,3; 16,4; e 18,5 mm, nos respectivos tempos de cultivo: 20, 40 e 60 dias.

Segundo George (1993), o balanço entre auxina e citocinina é geralmente requerido para iniciar o crescimento ou diferenciação do tecido cultivado.

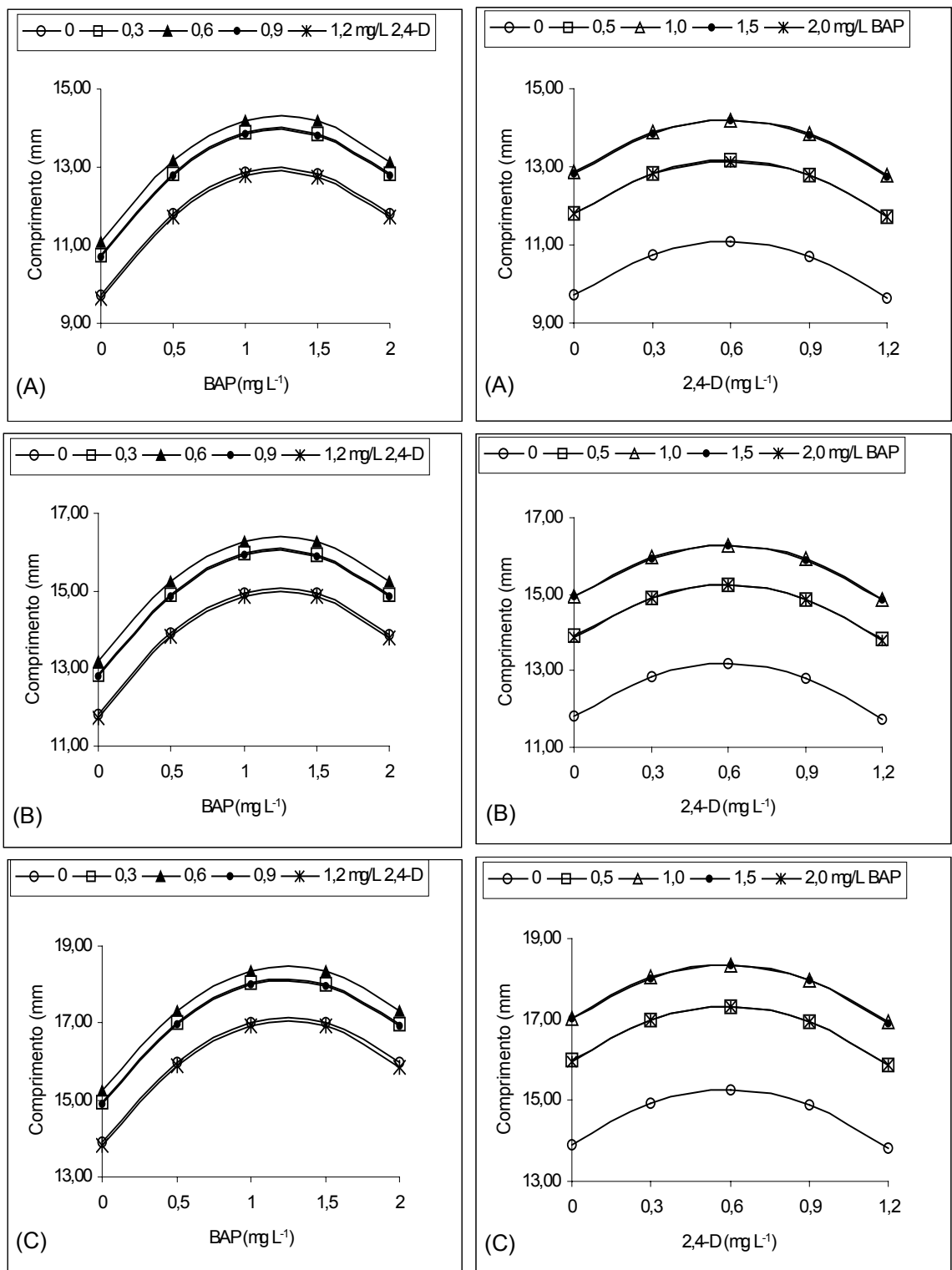


Figura 4 - Estimativas do comprimento (mm) dos explantes em função das diferentes concentrações de BAP e 2,4-D, aos 20 (A); aos 40 (B); e aos 60 (C) dias de cultivo.

Carvalho (2002), em condições similares, verificou que os melhores resultados para comprimento foram influenciados apenas pela concentração de 2,4-D ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$), aos 57 dias de cultivo.

Na literatura consultada não há referência sobre a avaliação da variação do comprimento dos explantes, com o que não será possível confrontar nossos resultados. Não obstante, o comprimento constituiu uma variável importante como medida do crescimento, pois explantes que apresentaram maior matéria fresca e maior comprimento, portanto, os mais vigorosos, possibilitaram a formação de maior número de estruturas (protocormóides ou gemas adventícias), que é o objetivo principal na propagação *in vitro* de orquídeas.

1.3. Coloração dos explantes e do meio de cultivo

Com base em observações visuais, realizou-se uma análise descritiva da coloração dos explantes. Após 20 dias de cultivo, 48 % do total de explantes permaneciam com a coloração verde original e os 51 % restantes conservavam verdes, porém, com as extremidades apicais oxidadas (cor marrom escura), provavelmente em consequência da exsudação de substâncias fenólicas (Arditti & Ernst, 1992).

Aos 40 dias de cultivo, 16,8 % dos explantes mantinham a cor verde original; 69,3 %, verdes com as extremidades apicais oxidadas, e 13,9 % mostravam-se completamente oxidados. Já aos 60 dias, apenas 8,0 % dos explantes continuavam plenamente verdes, 40,3 %, verdes com as extremidades oxidadas e 51,7 %, totalmente oxidados. Porém, em razão de o meio estar no estado líquido e sob agitação, estas substâncias se diluíam, não prejudicando, aparentemente, o desenvolvimento morfogênico dos explantes (George, 1993).

A coloração do meio de cultivo também foi avaliada visualmente. O meio de cultivo permaneceu, nos primeiros 20 dias de incubação, com a coloração límpida, em 91 % dos frascos. Apenas 8 % do total de frascos mostravam coloração rósea, provavelmente devido à exsudação de substâncias fenólicas; e em apenas 1 % dos frascos a coloração era amarelada.

Aos 40 dias de cultivo, verificou-se redução significativa do número de frascos (57 % do total), cuja coloração do meio permaneceu límpida. Em outros 40 % dos frascos, o meio apresentava coloração rósea e em apenas 3 % exibía coloração amarelada.

Da mesma forma que o estado oxidativo dos explantes aumentou com o período de incubação, também a turbidez do meio intensificou-se com o passar do tempo. Sugere-se, a princípio, acumulação de substâncias fenólicas. Assim, aos 60 dias de incubação, o meio de cultivo de 63 % dos frascos mostrava coloração rósea escura, 8 % róseo-clara a róseo e em apenas 29 % dos frascos, a coloração permanecia límpida. Portanto, não são recomendáveis períodos de incubação superiores a 60 dias.

De acordo com os resultados, há necessidade de, em futuros trabalhos, estudar o efeito da renovação periódica do meio de cultivo sobre a resposta morfogênica dos explantes, bem como identificar as substâncias fenólicas, objetivando o uso de substâncias inibidoras da síntese e da ação dos fenóis sobre os explantes.

1.4. Número de estruturas

O número de estruturas formadas a partir dos explantes primários foi afetado pelo período de incubação (T) e pela concentração de BAP (B) adicionada ao meio de cultivo. O modelo de regressão que explicou o processo foi $\hat{E} = -4,93668 + 0,300045^{**} T - 0,0031624^{**} T^2 + 4,31705^{**} B - 1,80286^{**} B^2$, ($R^2 = 0,6362$).

Pelo modelo estabelecido, observa-se comportamento quadrático do tempo de cultivo e da concentração de BAP, em que o ponto de máximo para formar maior número de estruturas por explante é aos 47 dias, utilizando 1,20 mg L⁻¹ de BAP, formando em média 4,8 estruturas por explante (Figura 5).

Pierik & Steegmans (1972), estudando o efeito do BAP no crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya aurantiaca* Rolf, concluíram que altas concentrações de BAP (10 mg L⁻¹) favoreciam a formação de protocormóides e plântulas, à semelhança com resultados obtidos neste trabalho, porém sendo utilizadas concentrações menores de BAP.

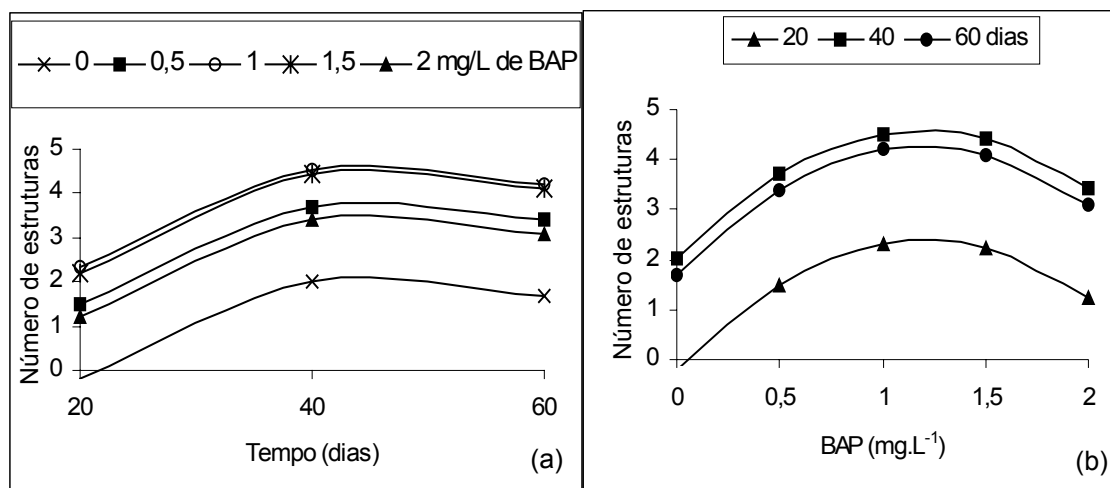


Figura 5 - Estimativas do número de estruturas formadas por explante, em função de: (a) intervalos de tempo de cultivo para respectivas concentrações de BAP (mg L^{-1}); e (b) diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}) para os respectivos intervalos de tempo.

Mauro *et al.* (1994) ao estudarem a influência do BAP e do ANA para a multiplicação da parte aérea, utilizaram como explantes plântulas de *Cattleya aurantiaca* Rolf, sem raízes e com as folhas cortadas de modo que o comprimento fosse de 2 a 4 mm. Concluíram que para a multiplicação de parte aérea, em que somente os protocormóides bem desenvolvidos foram contados, a interação dos dois fitorreguladores foi altamente significativa, alcançando melhores resultados ao combinar 10 mg L^{-1} de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA.

Carvalho (2002), utilizando explantes do híbrido *Cattleya walkeriana* 'Estrela Dalva' x *C. walkeriana* 'Coerulea', em condições similares às deste trabalho e também testando os efeitos das concentrações de BAP e 2,4-D, verificou que a formação de estruturas não foi influenciada pelos fitorreguladores.

Arditti e Ernst (1992) mencionam que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D é a combinação que normalmente proporciona maior formação da parte aérea; sendo a de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA aquela que proporciona maior proliferação de protocormóides.

Esses resultados, portanto, diferem do obtido neste trabalho, confirmando que para cada genótipo é necessário um método específico para formação e desenvolvimento de estruturas (Arditti & Ernst, 1992).

As estruturas formadas (Figura 6, A-D) na base dos explantes: calo, protocormóides ou gemas adventícias, ora permaneciam conectadas ao explante, ora se desprendiam do mesmo, talvez em consequência do cultivo dos explantes em meio líquido, sob constante agitação.

Em cada tratamento, foi estimado o número médio de estruturas neoformadas e que se destacaram do explante, sendo analisado descritivamente. Somente na tomada de dados aos 40 dias de cultivo, verificou-se a separação de estruturas formadas (protocormóides), mesmo assim em apenas três dos vinte e cinco tratamentos, nos quais se desprenderam de 1 a 2 protocormóides por explante. Somente em um dos tratamentos observou-se formação de calo na base dos explantes.

Aos 60 dias de cultivo, em nove dos tratamentos (36% do total), verificou-se a separação de estruturas, sendo, em média, uma por explante. Dentre estes tratamentos, quatro deles formaram, ao mesmo tempo, estruturas e calo. Em outros seis distintos tratamentos, formaram-se apenas calos na base de cada explante.

Segundo Morel (1970), como uma primeira reação, observa-se a formação de calo nos rudimentos foliares rígidos, ou no tecido conectivo da folha, onde aparecem grandes células paliçadas que, mais tarde, é possível notar, entre estas grandes células hipertróficas, a formação de um pequeno grupo de células meristemáticas que se estabelecem próximo ao tecido necrosado ou perto do ápice da gema. Ao mesmo tempo, as escamas mais externas tornam-se verdes e com seus tecidos conectivos aumentando de volume e tornando-se ondulados. Após dois meses, as áreas meristemáticas eventualmente formam protocormóides, que se desenvolvem em plântulas. O que pode ser observado semelhantemente nesse experimento. Porém, muitos trabalhos consultados são conflitantes em relação à estrutura formada, se calos ou protocormóides.

Embora nos itens 3.1.1 e 3.1.2, observam-se que para a produção máxima de ambos, matéria fresca e comprimento dos explantes, o melhor tempo de incubação foi o de 60 dias. Verifica-se que para a produção do maior número de estruturas, o melhor tempo foi aos 47 dias, provavelmente, a matéria fresca e o comprimento dos explantes alcançados neste período tenha sido suficientes para produzir maior número de estruturas, considerando-se, inclusive, que a concentração de substâncias fenólicas oxidadas nas regiões de contato dos explantes e meio de cultivo passou a prejudicar a resposta morfogênica.

3.2. Processo de organogênese

3.2.1. Resposta organogênica dos explantes primários e das novas estruturas formadas

Observou-se, após 30 dias de cultivo no meio sólido, grande variação na resposta organogênica dos explantes primários e das novas estruturas formadas que se destacaram espontaneamente. Parte dos explantes apresentava oxidação total, enquanto os demais desenvolviam-se em plântulas, em grande número (Figura 7, A-D). Algumas destas, inclusive, apresentavam desenvolvimento de sistemas radiculares e formação de protocormóides, após 140 dias de cultivo (Figura 7, E-F).

A organogênese em monocotiledôneas, segundo George (1993), é geralmente promovida pela transferência da cultura para um meio de cultivo sem adição de auxina, ou com concentrações reduzidas de auxinas altamente ativas, como 2,4-D, ou com a substituição desta por outra auxina (AIA ou ANA). De acordo com Pierik & Steegmans (1972), para que os protocormóides formados se desenvolvam em plântulas, é necessária a transferência para o meio sem BAP, pois altas concentrações deste fitorregulador provocam deformação dos explantes e a paralisação do desenvolvimento radicular.

Verificou-se, neste trabalho, que o processo de organogênese ocorreu de forma mais acentuada quando os explantes primários e secundários foram transferidos para um meio de cultivo sem reguladores de crescimento.

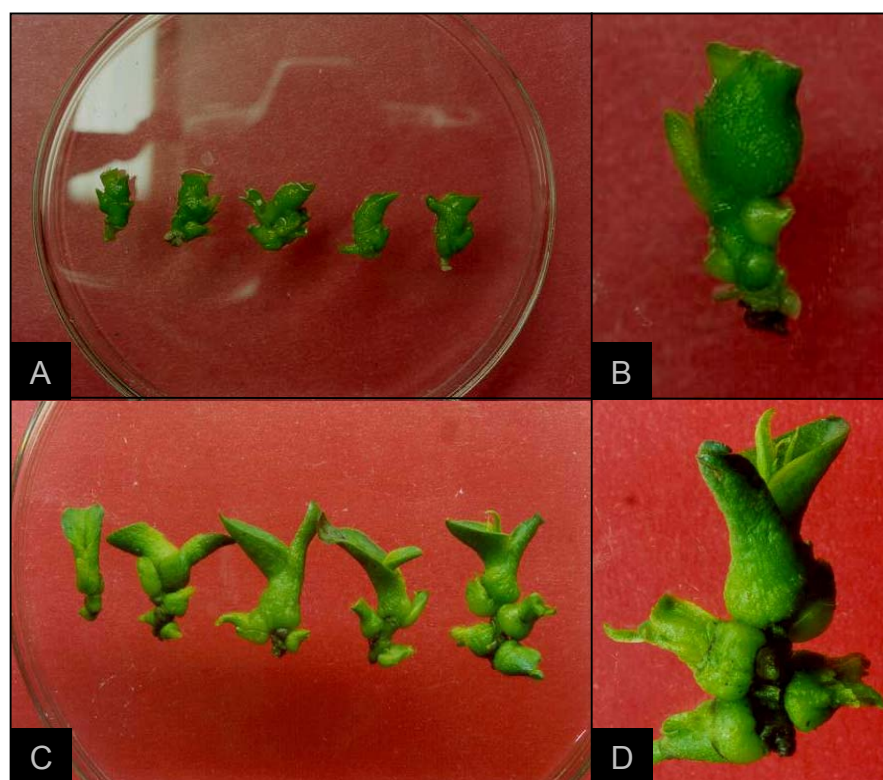


Figura 6 - Desenvolvimento dos explantes após 30 dias de cultivo (A); detalhe das estruturas formadas na base dos explantes (B); desenvolvimento dos explantes após 60 dias de cultivo (C); e detalhe das estruturas formadas (D).

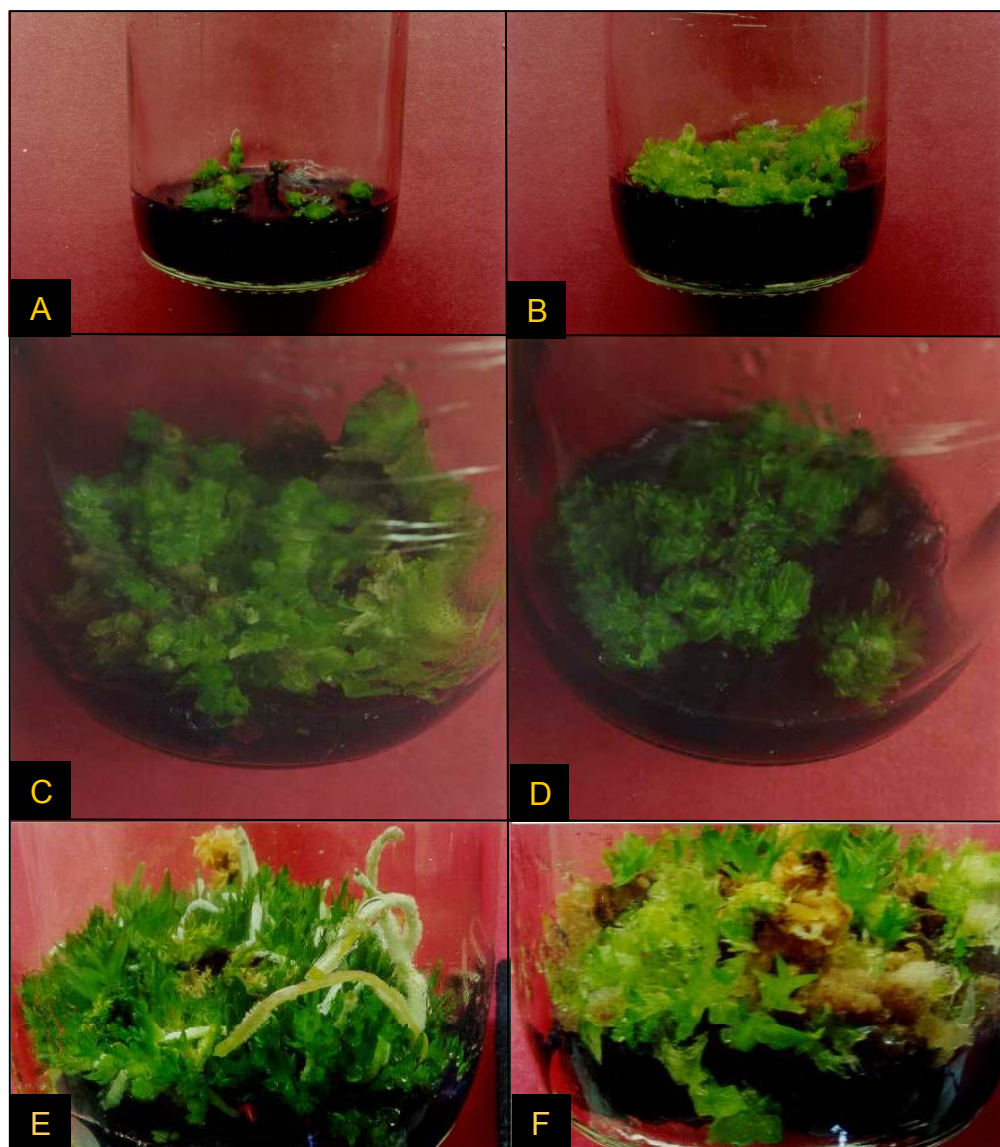


Figura 7 - Aspectos dos explantes ao transferi-los aos 60 dias do meio líquido para o meio MS sólido (A e B); aspectos destes explantes aos 30 dias (C e D); e aos 140 dias (E e F), com ênfase, nesta última etapa, para a presença de sistema radicular e de protocormóides nos explantes.

Isto é parcialmente explicado pela origem dos explantes. Sabe-se que as orquídeas apresentam altas taxas de heterozigose, portanto, plântulas originadas de sementes têm grande variação genética (Reinert & Mohr, 1967). Possivelmente, as concentrações endógenas de reguladores de crescimento sintetizados pelos explantes, durante o cultivo, podem ter influenciado estas respostas.

No meio de cultivo sólido e sem regulador de crescimento, o maior nível de oxidação dos explantes ocorreu naqueles anteriormente cultivados em ausência de BAP ou em baixas concentrações ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), independentemente da concentração de 2,4-D. Houve menor número de explantes oxidados e, por sua vez, maior porcentagem de explantes que formaram plântulas nos frascos de cultivo que procederam dos tratamentos cujas concentrações eram superiores a $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Quadro 2).

Dentre as poucas estruturas formadas na base dos explantes e que se destacaram espontaneamente, obtidas nos tratamentos com as respectivas concentrações de BAP/2,4-D: 0,5/1,2; 1,5/0,6; 1,5/0,9; e 2,0/0,0 mg L^{-1} , apenas quatro completaram o seu desenvolvimento organogênico. As demais estruturas formadas, num total de 44 (em número absoluto), apresentaram-se totalmente oxidadas.

Quadro 2 - Porcentagem de explantes primários e de novas estruturas oxidadas, originadas em meio de cultivo líquido com diferentes concentrações de BAP e 2,4-D, quando inoculadas em meio de cultivo sólido sem regulador de crescimento (após 60 dias de cultivo no meio líquido referido)

Tratamentos		2,4-D (mg L ⁻¹)			
BAP (mg L ⁻¹)	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2
0,0	100	95	95	100	100
0,5	100	75	80	90	100
1,0	75	75	55	55	50
1,5	75	100	100	40	40
2,0	70	75	60	25	20

Na literatura revisada, não se faz referência ao estado oxidativo dos explantes e das novas estruturas destacadas. É de Carvalho (2002), ao trabalhar com o mesmo tipo de explantes, oriundos do híbrido *Cattleya walkeriana* 'Estrela Dalva' x *C. walkeriana* 'Coerulea', empregando as mesmas condições e metodologia deste trabalho, a única referência sobre este aspecto, observando comportamento semelhante da resposta organogênica e do estado oxidativo.

Reinert & Mohr (1967), ao testar a propagação *in vitro* de uma espécie de *Cattleya* (não citada), utilizando ápices meristemáticos extraídos de gemas laterais, cultivados em meio líquido, obtiveram a formação de um a três protocormóides, que se desenvolveram em plântulas quando cultivados em meio sólido de mesma composição. Da mesma forma, Scully (1967), citado por Arditti & Ernst (1992), utilizando o mesmo de tipo de explantes de *Cattleya* que o trabalho anteriormente referido, logrou êxito cultivando os explantes em meio líquido, onde os protocormóides eram formados, divididos e subcultivados em meio sólido, onde se desenvolviam em plântulas.

Kako (1973), citado por Arditti & Ernst (1992), relata que quando os protocormóides são transferidos inteiros para o meio sólido, a porcentagem de sobrevivência é maior. Contudo, obtém-se o dobro do número de calos com os cortes, mesmo com as perdas.

Neste trabalho, em pré-testes com *BC Daffodil* x *SLC Hazel Bayd* 'Sunset', os protocormóides formados eram inoculados, alguns inteiros e outros subdivididos, em meio de cultivo sólido, constituído de minerais nutrientes de MS, sem regulador de crescimento. Observou-se que não houve desenvolvimento dos protocormóides subdivididos, os quais ficaram totalmente oxidados. Optou-se, no entanto, pela não divisão dos explantes primários e das estruturas formadas quando transferidos para o meio de cultivo sólido.

Conclusão

A maior produção de matéria fresca por explante foi alcançada aos 60 dias de cultivo, em meio líquido, com $1,28 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

O comprimento máximo (mm) foi obtido aos 60 dias de cultivo, em meio líquido, com $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

O maior número de estruturas formadas por explante deu-se na concentração de $1,20 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, aos 47 dias de cultivo em meio líquido.

Para o híbrido utilizado, é recomendado o cultivo por 47 dias, em um meio líquido de cultivo, constituído de minerais nutrientes de MS e contendo $1,24 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

**Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e
axilares de plantas adultas de *Laelia lobata* ‘Jenni’ x *L.*
lobata alba**

Resumo

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares e gemas axilares é importante para uma rápida e eficiente propagação clonal, por manter a uniformidade, estabilidade e identidade genética. O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e de gemas axilares, identificando o melhor explante para *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* alba. Ápices caulinares (3-9 mm² da base) e gemas axilares (2-16mm² da base) foram retirados de brotações e de pseudobulbos de plantas adultas, após desinfestação. Estes explantes foram inoculados em meio de cultivo líquido com a formulação de Murashige & Skoog (1962) contendo 0,2 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Após 50 dias e já com formação de estruturas, os explantes foram transferidos para meio de mesma composição, porém sólido, com carvão ativado e sem fitorreguladores. Os tratamentos constituíram-se de três tipos de explantes: 24 ápices caulinares (AC), 19 gemas axilares de brotações (GB) e 10 gemas axilares de pseudobulbos (GP). O experimento foi montado segundo delineamento inteiramente casualizado. Foram avaliados a porcentagem de estruturas formadas, o aspecto fisiológico dos explantes e, também, a área final dos explantes, para esta utilizou-se teste de Tukey. Os explantes GB foram os que apresentaram maior porcentagem de estruturas formadas (47,4%), seguidos dos GP (20%) e AC (12,5%). O melhor comportamento de GB, provavelmente, deveu-se à menor porcentagem de oxidação dos explantes e recuperação morfogênica destes, quando oxidados. Os explantes GB apresentaram maior área final aos 50 dias de cultivo. O grau de oxidação dos explantes foi avaliado como totalmente oxidado (71,7%); oxidado com ápice verde (7,5%); verde com extremidade oxidada (7,5%); e verde expandido (13,2%). Embora os três tipos de explantes apresentassem alta porcentagem de oxidação, todos mostraram boa capacidade morfogênica, principalmente as gemas axilares de brotações, potencializando uma via real para propagação em escala comercial dessa espécie.

Palavras-chave: ápices caulinares, orquídea, morfogênese *in vitro*.

Introdução

O gênero *Laelia*, um componente do grupo *Cattleya*, cuja maioria de suas espécies são autóctones do Brasil meridional (Menezes, 1995), é muito utilizado na hibridação, em decorrência de sua excelente forma, cor e fragrância (Eigeldinger & Murphy, 1972). Reinert & Mohr, já em 1967, citavam os esforços dos fitomelhoristas que almejavam obter híbridos de orquídeas, apresentando flores com maior qualidade e novas tonalidades.

Como resultado de cruzamentos, os híbridos de orquídeas constituem progênies desuniformes, em razão da elevada taxa de segregação gênica. Portanto, sua propagação pela via seminífera produzirá uma população heterogênea de plantas (Pierik, 1990). A partir das progênies, é possível selecionar desde plantas com qualidades de alto padrão agrônomo até aquelas, em princípio, sem valor. Por isso, é importante que a propagação seja realizada a partir de plantas adultas, em que suas flores, produto final desejado, já tenham sido avaliadas, de acordo com os padrões de qualidade.

Muitas espécies e híbridos deste gênero são raros e apresentam risco de extinção, em decorrência principalmente do extrativismo predatório e da devastação dos seus *habitats* (Menezes, 1995 e Gloeden, 1998). Por exemplo, *Laelia fidelensis* Pabst., *L. grandis* Lindl. et Paxt., *L. jongheana* Reinback, *L. lobata* (Lindl.) Veitch., *L. perrinii* (Lindl.) Paxt., *L. tenebrosa* Rolf., *L. virens* Lindl., *L. xanthina* Lindl., como citado pelo IBAMA (1999).

Em face da importância econômica, botânica e ecológica das espécies e híbridos de *Laelia*, faz-se necessária sua propagação rápida e em larga escala, de modo a manter-se nos descendentes as mesmas características agrônomicas da planta-matriz.

Recomenda-se, no entanto, processos de propagação vegetativa, com preferência pelos métodos de cultivo *in vitro*, por serem mais rápidos e de maior rendimento, se comparados com o principal método de propagação vegetativa desta planta que é o de divisão de touceiras (Reinert & Mhor, 1967).

As orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas *in vitro* em escala comercial (Prakash *et al.*, 1996). Embora explantes possam ser obtidos de distintas partes da planta-matriz, as gemas axilares e ápices caulinares são os tipos de explantes mais utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas, por possibilitar a limpeza clonal, a conservação e o intercâmbio de germoplasma (Prakash *et al.*, 1995), além de manter a uniformidade, estabilidade e identidade genotípicas (Pierik, 1990).

Segundo revisão de Arditti & Ernst (1992), os referidos tipos de explantes são geralmente extraídos da base de brotações laterais em crescimento, com 1 a 15 cm de comprimento (Scully, 1967; Kako, 1973; Lindemann *et al.*, 1970; Morel, 1970 e Huang, 1984), ou de pseudobulbos e rizomas de plantas adultas (Reinert & Mohr, 1967 e Vajrabhaya, 1978). Não obstante, quando os explantes procedem de plantas cultivadas a céu aberto ou em casa de vegetação, é necessário um eficiente método de desinfestação da planta-matriz e dos explantes delas extraídos, para assegurar o cultivo axênico (George, 1993).

Uma vez que, para cada espécie ou híbrido é necessário um protocolo específico para sua propagação *in vitro*, este trabalho objetivou determinar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e gemas axilares de *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* alba, identificando o melhor tipo de explante para este híbrido.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Origem e tipo de explantes

Os explantes foram extraídos de plantas adultas do híbrido *Laelia lobata* ‘Jenni’ x *Laelia lobata* alba, com sete anos de idade, cultivadas em casa de vegetação (Figura 1).

Foram utilizados, como explantes, ápices caulinares e gemas axilares, procedentes de brotações laterais, além de gemas axilares oriundas da base dos pseudobulbos com folhas completamente desenvolvidas (Figura 2). Os tamanhos de brotações e pseudobulbos variaram de 2,4 a 10,8 cm de comprimento. A área da base inicial dos explantes variou de 2 a 16 mm² (Quadro 1).

2. Desinfestação e preparação dos explantes

As brotações e as bases dos pseudobulbos retiradas das plantas-matrizes inicialmente foram tratadas com solução de detergente neutro para laboratório 50% v/v (Vetec[®]), por 5 minutos, enxaguadas com água desionizada estéril e autoclavada até a retirada de todo o detergente. Em seguida, foram tratadas com álcool 70% v/v, por 5 minutos. Posteriormente, sob condições de câmara de fluxo laminar, as mesmas fontes de explantes foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2% v/v (água sanitária comercial pura), por 20 minutos, seguido de quatro enxaguaduras sucessivas com água desionizada estéril nos respectivos tempos de 5; 10; 10; e 10 minutos. Durante todo o processo de desinfestação, os frascos que continham o material imerso nas soluções desinfestantes e também na água foram agitados manualmente, em intervalos periódicos.

Quadro 1 - Tamanho das brotações (Tb) e área dos explantes extraídos de ápices caulinares e gemas axilares das brotações e das gemas axilares da base dos pseudobulbos.

Rep.	Tb cm	Ápices caulinares	Gemas de brotações (mm ²)	Gemas de pseudobulbos
1	2,4	2 x 2	-	-
2	4,4	3 x 2	2 x 2 e 3 x 2	-
3	3,5	2 x 2	-	-
4	5,0	2 x 2	-	-
5	4,3	2 x 2	-	-
6	4,5	1 x 2	3 x 3	3 x 2
7	4,7	3 x 2	3 x 4	2 x 2
8	5,2	2 x 2	3 x 2	3 x 2 e 3 x 3
9	5,8	3 x 2	3 x 5	3 x 2
10	6,5	3 x 2	3 x 4	2 x 4
11	5,2	3 x 3	2 x 4	-
12	7,9	3 x 2	3 x 2	3 x 2
13	6,9	3 x 2	3 x 1	-
14	6,5	2 x 2	-	3 x 1
15	7,0	3 x 1	3 x 2	-
16	8,7	2 x 2	3 x 4 e 3 x 2	-
17	7,5	3 x 2	4 x 4	2 x 1
18	8,2	3 x 2	2 x 2 e 2 x 4	-
19	11,0	3 x 2	-	3 x 1
20	9,2	3 x 1	-	-
21	10,8	3 x 3	3 x 1	-
22	12,5	2 x 2	-	-
23	4,2	2 x 2	2x4	-
24	8,0	1 x 2	2x2	-

Obs.: 1-2 e 23-24 são duas brotações retiradas da base de um mesmo pseudobulbo.

Anteriormente, ainda sob condições de câmara de fluxo laminar, utilizando-se lupa (Nikon, com poder de aumento de 40 vezes), retiraram-se as folhas mais externas mediante o uso de pinça e bisturi de aço inoxidável, procedendo-se, posteriormente, cortes longitudinais e transversais, de modo a obterem-se ápices caulinares portando alguns primórdios foliares. Este processo foi realizado em placa de petri, sendo as brotações e bases dos pseudobulbos imersas em água de coco natural e filtrada, para evitar oxidação e desidratação dos explantes. Preparados os explantes, estes foram imersos sucessivamente, por alguns segundos, em álcool 70% v/v, em hipoclorito de sódio 0,1% v/v (água sanitária comercial) e em água desionizada estéril.

Visando evitar ou reduzir a oxidação fenólica, os explantes permaneceram por 16 a 20 horas na sala de transferência, imersos em água de coco natural, previamente esterilizada por filtroesterilização, sob condições de câmara de fluxo laminar e utilizando-se filtro com poro de 22 μm . Posteriormente, foram transferidos para o meio de cultivo.

3. Fase morfogênica

Após este curto período de incubação, os explantes foram transferidos para o meio de cultivo descrito a seguir, visando ao processo morfogênico.

3.1. Composição, preparação e distribuição do meio nos frascos de cultivo

Com vistas ao processo morfogênico, os explantes foram cultivados em um meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), com aumento gradativo da concentração do componente ferro nos recultivos semanais (Figura 2). O meio de cultivo continha ainda 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0,2 mg L⁻¹ de cinetina, 1,0 mg L⁻¹ de ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 50 mL L⁻¹ de água de coco natural. Nos primeiros sete dias, o componente ferro foi adicionado a $\frac{1}{5}$ de sua concentração normal; na segunda semana, aumentou-se sua concentração para $\frac{1}{2}$ e, a partir da terceira semana, foram adicionados em sua concentração normal 27,8 mg L⁻¹ de sulfato ferroso.

O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, sendo posteriormente distribuídos 5 mL de meio em tubos de ensaio, com dimensões de 25 x 150 mm e previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 30 minutos. Após a distribuição do meio, os tubos de ensaios foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C, pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

3.2. Inoculação dos explantes

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os explantes, um em cada tubo de ensaio, foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente.

Depois de inoculados os explantes, os tubos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®), envoltos em papel alumínio, para proteção contra luz.

3.3. Período e condições de incubação

Os tubos de ensaio foram distribuídos aleatoriamente em uma mesa rotatória inclinada sob agitação orbital de 3 rpm, incubados na sala de cultivo à temperatura de $27 \pm 2 \text{ °C}$, permanecendo sete dias no escuro. Após este período, os explantes foram recultivados para meio de mesma composição, porém com o componente ferro à metade da sua concentração normal na formulação de MS (Murashige & Skoog, 1962) e nas mesmas condições anteriores de cultivo, por mais uma semana.

Após 14 dias no escuro, os explantes foram recultivados para meio de mesma composição, porém com o componente ferro em sua concentração normal, quando então foram transferidos para luz, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro) e irradiância de $15 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W), mantidas as demais condições,

permanecendo por 38 dias, até intumescimento e início de desenvolvimento das gemas.

3.4. Características avaliadas

Para analisar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e gemas axilares desse híbrido, quando os explantes foram recultivados nos períodos de sete, 14 e 50 dias de cultivo, em condições de câmara de fluxo laminar, avaliaram-se, a partir de cada explante, as seguintes características:

- a) porcentagem de contaminação visualmente detectável;
- b) estado fisiológico dos explantes, por meio do seu grau de oxidação: explantes totalmente oxidados; explantes oxidados com ápice verde; explantes verdes com extremidades oxidadas; e explantes verdes expandidos (Figura 3);
- c) coloração do meio de cultivo; e
- d) área final dos explantes, medida mediante uso de papel milimetrado.

3.5. Delineamento experimental

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os três tipos de explantes, com diferentes números de repetição. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio contendo um explante, sendo:

- a) tratamento 1: ápices caulinares, com 24 repetições;
- b) tratamento 2: gemas axilares de brotações, com 19 repetições;
- c) tratamento 3: gemas axilares de pseudobulbos, com 10 repetições.

3.6. Análise estatística

Os dados de área final dos explantes, aos 52 dias, foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para avaliar os demais dados, realizou-se uma análise estatística descritiva.



Figura 1 - Híbrido de *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* alba, do qual as brotações e os pseudobulbos foram retirados para extração dos explantes.

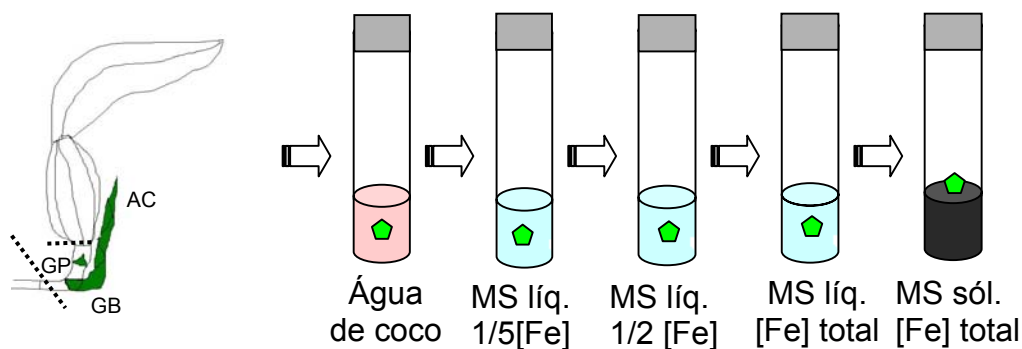


Figura 2 - Esquema ilustrativo dos tipos de explantes utilizados: ápice caulinar (AC), gema axilar (GB), ambos de brotações, e gema axilar da base de pseudobulbos (GP). Tipos de meios nos quais os explantes foram respectivamente cultivados.

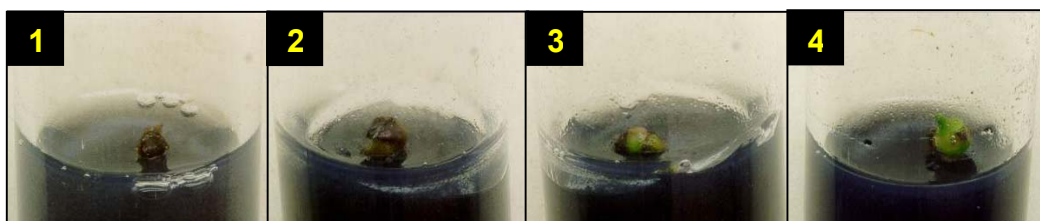


Figura 3 - Aspectos visuais do grau de oxidação dos explantes. (1) totalmente oxidado; (2) oxidado com ápice verde; (3) verde com extremidades oxidadas; e (4) verde expandido.

4. Fase organogênica

Após 50 dias de cultivo, os explantes, já intumescidos e com sinais aparentes de crescimento e desenvolvimento, foram transferidos para um novo meio, com vistas a induzir o processo organogênico.

4.1. Composição, preparação e distribuição do meio nos frascos de cultivo

Visando ao processo organogênico, os explantes foram cultivados em um meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado (Figura 2).

O meio de cultivo teve o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, antes da adição de 8 g L⁻¹ de ágar (Isofarma[®]) previamente fundido em microondas. Posteriormente, em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm, esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 30 minutos, foram distribuídos 5 mL de meio de cultivo. Após a distribuição, os tubos contendo o meio foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

4.2. Inoculação dos explantes nos frascos de cultivo

Após a esterilização e sob condição de câmara de fluxo laminar, os explantes, um em cada tubo de ensaio, foram inoculados no meio de cultivo, em temperatura ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os tubos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac[®]).

4.3. Condições de incubação

Os tubos de ensaio dispostos em grades de metal foram colocados em estantes, na sala de cultivo e mantidos a uma temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W), permanecendo nestas mesmas condições por 142 dias.

4.4. Características avaliadas

Para analisar a capacidade organogênica de ápices caulinares e gemas axilares desse híbrido, quando transferidos para meio sólido sem regulador de crescimento e após um total de 78 dias de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de sobrevivência dos explantes, o desenvolvimento e a formação de novas estruturas e, ou, plântulas ao completar 142 dias de cultivo.

4.5. Análise estatística

O experimento foi montado segundo delineamento inteiramente casualizado, com diferentes números de repetição. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio contendo um explante.

As características foram avaliadas por meio de estatística descritiva.

Resultados e discussão

1. Fase morfogênica ou estabelecimento e indução

1.1. Porcentagem de contaminação

Nos primeiros sete dias de cultivo, não se observou nenhuma contaminação aparente. Aos 14 dias, obteve-se baixa porcentagem de contaminação, apenas 1,9 % do total de 53 explantes, sendo a contaminação por fungo em um tubo de ensaio, cujo explante tinha sido extraído da base do pseudobulbo. Até aos 50 dias de cultivo, não se observou contaminação aparente.

Reinert & Mohr (1967), Scully (1967), Lindemann *et al.* (1970), Kako (1973) e Vajrbhaya (1978), citados por Arditti & Ernst (1992), utilizaram para desinfestar explantes procedentes de plantas adultas de *Cattleya* solução de cloro comercial, cuja concentração foi de 0,1 a 20 %, em períodos de exposição que variaram de 5 a 30 minutos, álcool 70 e 95 %, por 5 minutos, e solução de hipoclorito de cálcio (0,4 a 8,0 %), por 20 a 30 minutos, dependendo do tipo de explante utilizado. Nesses trabalhos, não foi referida a porcentagem de contaminação dos explantes.

Quanto ao método de desinfestação utilizado neste trabalho, pode-se considerá-lo eficiente para se obter explantes axênicos, em razão da baixa porcentagem de contaminação. Entretanto, em comparação aos métodos utilizados em outros trabalhos, a desinfestação usada nesta pesquisa foi rigorosa, uma vez que foram utilizados detergentes próprios para laboratório, álcool 70 % e água sanitária com 2 % v/v do produto comercial (Super Globo®) em hipoclorito de sódio.

1.2. Estado fisiológico dos explantes e coloração do meio de cultivo

Os explantes avaliados visualmente em relação ao estado oxidativo mostraram-se responsivos ao meio e às condições de cultivo (Quadro 2). Nos primeiros sete dias, todos os explantes apresentavam-se oxidados. Quando transferidos para o meio contendo a metade da concentração de ferro, até aos

14 dias, a porcentagem de explantes que se apresentavam oxidados com os ápices verdes e verdes com as extremidades oxidadas aumentou. Nenhum explante apresentou sinal de expansão.

Entre os 14 e 50 dias de cultivo, quando os explantes permaneceram em meio líquido, com a concentração normal do componente ferro, houve aumento da porcentagem de explantes que se apresentavam verdes e com as extremidades oxidadas e verdes expandidos, denotando resposta ao processo morfogênico.

Essa alta porcentagem de explantes oxidados poderia ser atribuída à sensibilidade dos tecidos aos agentes desinfestantes utilizados e atenuada pelo método de desinfestação, empregado neste trabalho. De acordo com Pierik (1990), ápices muito pequenos, como para isolamento de meristemas, são freqüentemente tenros e susceptíveis aos agentes desinfestantes.

Elevada porcentagem de tubos de ensaios mostrava o meio de cultivo líquido com aspecto da solução límpida (Quadro 2), no decorrer do período de incubação até aos 50 dias, quando os explantes foram transferidos para o meio sólido, sem reguladores de crescimento.

Foi importante a preparação dos explantes imersos em água de coco natural e filtrada e cultivados inicialmente em meio líquido, muito embora, com apenas uma semana de cultivo, tenha-se observado a oxidação da maioria dos explantes. Segundo Pierik (1990), no caso de cultivo de ápices meristemáticos de *Cattleya*, os tecidos lesionados produzem, em curto período de tempo, coloração marrom. Com base nisso, recomenda-se que os meristemas sejam preparados dentro de um meio líquido e cultivados depois, também, em meio de cultivo líquido, visando facilitar melhor difusão das substâncias exsudadas pelos explantes, o que pode ser confirmado neste trabalho.

Quadro 2 - Porcentagem de ápices caulinares, gemas de brotações e gemas de pseudobulbos com o respectivo grau de oxidação dos explantes e coloração do meio de cultivo

Período	Grau de oxidação e coloração	Ápice caulinar	Gemas de brotações	Gemas de pseudobulbos
		%		
7 dias	Totalmente oxidado	100	100	100
	Oxidado com ápice verde	-	-	-
	Verde com extrem. oxid.*	-	-	-
	Verdes expandidos	-	-	-
	Límpido	100	84,2	100
	Róseo	-	15,8	-
14 dias	Totalmente oxidado	20,8	36,8	66,7
	Oxidado com ápice verde	75	52,6	22,2
	Verde com extrem. oxid.*	4,8	10,6	11,1
	Verdes expandidos	-	-	-
	Límpido	100	94,7	100
	Róseo	-	5,3	-
50 dias	Totalmente oxidado	87,5	52,6	66,7
	Oxidado com ápice verde	-	-	-
	Verde com extrem. oxid.*	8,3	47,4	33,3
	Verdes expandidos	4,2	-	-
	Límpido	45,8	47,4	77,8
	Róseo	54,2	47,4	11,1
	Amarelo	-	5,2	11,1

* verdes com extremidades oxidadas

O meio de cultivo teve a concentração do componente ferro aumentada gradativamente, 5,56; 13,9; e 27,8 mg L⁻¹ de sulfato ferroso, variando da metade, um quinto até a concentração total, visando evitar a oxidação dos explantes. Observou-se que os explantes mostraram mais responsivos ao

processo morfogênico, quando utilizadas as concentrações mais altas do componente ferro, embora tenha aumentado a porcentagem de meio de cultivo com a coloração róseo. Diferentemente de Stoltz (1979), que, ao estudar a influência do componente ferro na produção de matéria fresca e multiplicação de protocormóides em calos de *Cattleya labiata*, concluiu que o maior crescimento foi obtido quando utilizadas as concentrações de ferro quelatado entre 0,1 e 10 mmol L⁻¹, não tendo observado mudança visual na coloração dos explantes em nenhum tratamento.

1.3. Área média final dos explantes

Os sinais de crescimento e desenvolvimento dos explantes puderam ser observados pelo aumento da área média deles, durante esta fase.

Antes de os explantes serem transferidos para o meio sólido, como anteriormente citado, mediu-se a sua área, sendo considerada área final dos explantes na fase morfogênica aquela tomada aos 50 dias de cultivo (Quadro 3), apesar de continuarem crescendo e desenvolvendo na fase posterior, ou seja, fase organogênica.

A importância de se medir a área inicial e final é que o tamanho dos explantes determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento. Explantes muito pequenos são mais sensíveis aos agentes descontaminantes. Observa-se também que quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de se lograr êxito na obtenção de plantas livres de patógenos, além de manipular menos tecidos que possam levar contaminantes superficiais para as condições assépticas (Debergh & Zimmerman, 1993 e George, 1993). Outra vantagem de se trabalhar com quantidades mínimas de tecido é a redução dos controles correlativos do restante da planta, que podem diminuir a capacidade de resposta do explante *in vitro* (Bonga, 1987, citado por Grattapaglia & Machado, 1998).

Quadro 3 - Área final dos explantes extraídos de ápices caulinares e gemas axilares das brotações e das gemas axilares da base dos pseudobulbos, na fase morfogênica, aos 50 dias de cultivo

Rep.	Ápices caulinares	Gemas de brotações mm ²	Gemas de pseudobulbos
1	3 x 3	-	-
2	3 x 2	2 x 3 e 3 x 4	-
3	2 x 2	-	-
4	2 x 2	-	-
5	2 x 2	-	-
6	3 x 3	4 x 3	4 x 3
7	4 x 5	3 x 4	1 x 1
8	4 x 3	4 x 2	2 x 3 e 2 x 4
9	1 x 2	4 x 4	3 x 4
10	2 x 2	3 x 4	3 x 5
11	2 x 3	3 x 4	-
12	2 x 3	4 x 6	3 x 4
13	3 x 5	5 x 8	-
14	5 x 5	-	-
15	5 x 5	2 x 4	-
16	4 x 4	4 x 6 e 5 x 6	-
17	3 x 5	5 x 5	1 x 2
18	4 x 5	4 x 5 e 4 x 7	-
19	2 x 4	-	-
20	2 x 4	-	-
21	4 x 7	3 x 4	-
22	3 x 3	-	-
23	4 x 4	4 x 5	-
24	3 x 3	3 x 3	-

Ao avaliar a área média alcançada pelos explantes (Figura 4), observou-se que os explantes de gemas axilares de brotações (GB) alcançaram, em média, a maior área (16,8 mm²), diferindo significativamente da área das gemas axilares da base dos pseudobulbos (GP), que apresentaram em média 7,0 mm².

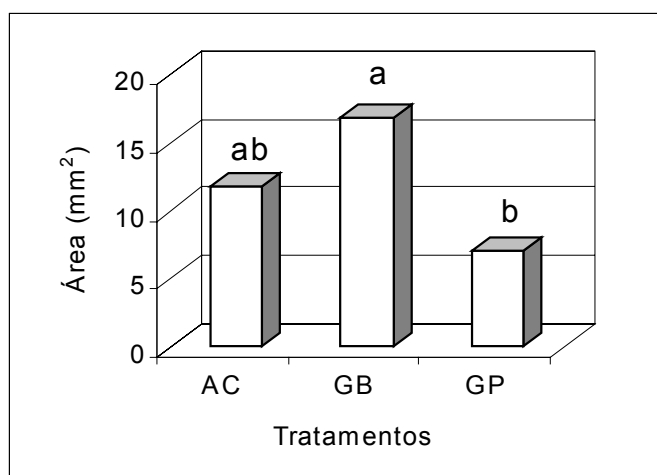


Figura 4 - Área média alcançada pelos três tipos de explantes avaliados. tratamento 1 - ápices caulinares (AC); tratamento 2 - gemas axilares de brotações (GB); e tratamento 3 - gemas axilares de pseudobulbos (GP), após 50 dias de cultivo *in vitro*. Colunas sob a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O maior aumento de área dos explantes de gemas axilares de brotação deveu-se, provavelmente, à menor porcentagem de oxidação e à melhor resposta morfogênica dos explantes, podendo resultar no desenvolvimento de algumas gemas axilares em plântulas completas.

Os trabalhos revisados não fazem referências a medidas de área final. Apenas o trabalho de Carvalho (2002), com base em gemas axilares e apicais de plantas adultas do híbrido avançado de *B/c*. Roberto Cardoso 'Floralia' X (*Lc*. Calminant 'La Tailerie' X *Lc*. Lina Cavalieri), utilizando-se metodologia e condições semelhantes às deste trabalho, refere-se a este tema, observando pequena resposta organogênica em apenas 16% das gemas apicais extraídas das brotações e nenhuma formação de plântulas a partir de gemas apicais e axilares.

2. Fase organogênica

Esta segunda fase do experimento, conduzida em meio de cultivo de mesma constituição quanto aos componentes químicos, porém solidificado, sem reguladores de crescimento, foi avaliada aos 78 e 142 dias de cultivo.

Segundo Leffring (1968), citado por Pierik (1990), os protocormos das plantas do gênero *Cattleya* formam-se geralmente em meios de cultivo líquidos e desenvolvem em plântulas em meios sólidos.

2.1. Porcentagem de sobrevivência e desenvolvimento dos explantes

Aos 78 dias de cultivo, os explantes de gemas axilares de brotações (GB) foram os que apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência (47,4% do total), seguidos dos de gemas axilares de pseudobulbos (GP) e ápices caulinares (AC), com as taxas de 20 % e 12,5 %, respectivamente, do total de explantes que sobreviveram (Figura 5).

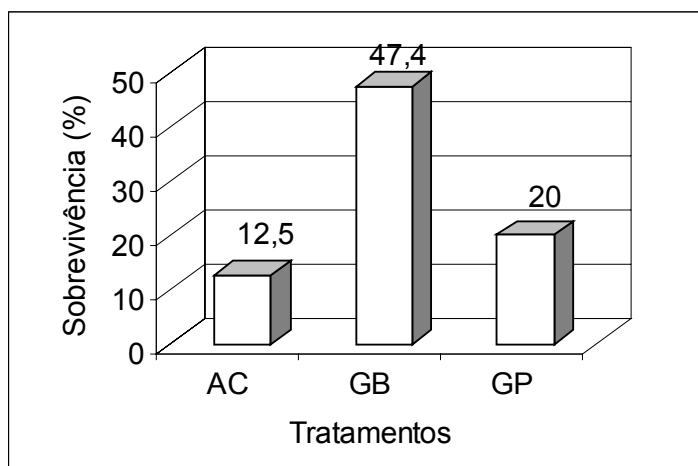


Figura 5 - Porcentagem de sobrevivência dos três tipos de explantes avaliados: tratamento 1 - ápices caulinares (AC); tratamento 2 - gemas axilares de brotações (GB); e tratamento 3 - gemas axilares de pseudobulbos (GP).

Após 142 dias de cultivo, observou-se, como resposta organogênica, a formação de um calo compacto de coloração verde em oito explantes, sendo sete deles procedentes de gemas axilares (GB ou GP), dentre as quais, uma formou várias partes aéreas e primórdios radiculares (Figura 6).

Estes resultados estão de acordo com Reinert & Mohr (1967), que observaram que gemas axilares originadas da base de brotações novas, surgidas nos rizomas, quando cultivadas inicialmente por três semanas em meio de cultivo líquido, proporcionam maior taxa de sobrevivência (75 %) e maior crescimento dos explantes, além do maior desenvolvimento de calo, geralmente em um período de tempo mais curto. Segundo estes autores, no meio líquido, a formação de plântulas é menos freqüente.

Para esses autores, ao transferir os explantes do meio líquido para o sólido, de mesma constituição química, houve certo bronzeamento dos explantes e o crescimento foi menor nas duas primeiras semanas. A partir da terceira semana, foi marcante o processo de morfogênese, formando 1 a 3 protocormóides por explante, os quais chegaram a plântulas.



Figura 6 – Desenvolvimento de partes aéreas e primórdios radiculares (à esquerda) e formação de estruturas (à direita), após 142 dias de cultivo em meio MS sólido, sem regulador de crescimento.

Da mesma forma, Scully (1967), Lindemann *et al.*, (1970) e Morel (1970), citados por Arditti & Ernst (1992), lograram êxito na propagação *in vitro* de plantas do gênero *Cattleya*, utilizando gemas em início de crescimento, procedentes de brotações novas, obtendo a formação de protocormóides e posterior desenvolvimento destes em plântulas. Huang (1984), citado pelos mesmos autores, utilizou como explantes gemas terminais e ápices caulinares, também procedentes de brotações de 2 a 5 cm de comprimento, emergentes

de plantas adultas. Durante o experimento, um mínimo de 500 plântulas foram obtidas de cada explante, após 10 meses de cultivo.

Kako (1973), citado por Arditti & Ernst (1992), utilizando a espécie *Brassocattleya* Princess Patrícia, logrou êxito na propagação por meio da cultura de ápice caulinar produzindo plântulas, quando se utilizou a terceira gema extraída de brotações novas em crescimento, com 15 cm de comprimento. O mesmo autor sugeriu que podem ser usadas outras gemas como explantes, embora desaconselha o uso daquelas já crescidas.

2.2. Estado fisiológico dos explantes

A avaliação visual do estado oxidativo dos explantes mostra que aos 78 dias de cultivo, 71,7 % dos explantes tornaram-se completamente oxidados, 7,5 % do total apresentavam-se oxidados com ápice verde e a mesma porcentagem (7,5 %) de outros explantes permaneceram verdes, porém com as extremidades oxidadas. Os explantes que permaneceram completamente verdes e apresentando expansão em volume corresponderam a 13,2 % do total.

É importante ressaltar que entre os três tratamentos, o constituído por gemas axilares oriundas de brotações foi o que apresentou menor porcentagem de explantes oxidados.

Após 142 dias de cultivo todos os explantes apresentavam-se completamente oxidados, apesar de alguns desenvolverem calos e plântulas, como mencionado no item anterior.

Conforme citado, os trabalhos revisados não fazem referência ao estado fisiológico dos explantes. Na maioria deles, utilizaram-se gemas laterais, logrando êxito na propagação *in vitro* de *Cattleya*. Ainda são conflitantes os meios de cultivo utilizados, bem como os tipos e as concentrações de reguladores de crescimento. Geralmente, utilizam meio líquido para o cultivo inicial e de manutenção, acrescidos de ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e cinetina, e um meio sólido sem fitorreguladores para crescimento-enraizamento. Neste experimento, em que foram utilizados ápices caulinares e gemas axilares, cultivadas em meio líquido de minerais nutrientes de MS, com

0,2 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de ANA, ocorreu o desenvolvimento morfogênico dos explantes. Quando estes foram transferidos para o meio sólido sem regulador de crescimento, houve a formação de plântulas, alcançando-se, assim, os objetivos almejados.

Outro ponto que deve ser futuramente investigado e que ainda não está claro refere-se à estrutura formada. De acordo com alguns autores, há formação de calo, segundo outros, há formação de protocormóides. No entanto, são necessários estudos anatômicos, que identifiquem o tipo de estrutura formada.

Conclusão

Embora os três tipos de explantes apresentassem alta porcentagem de oxidação, todos mostraram elevado potencial morfogênico, principalmente as gemas axilares de brotações, tornando-se uma via promissora para propagação em escala comercial desse híbrido.

**Morfogênese *in vitro* a partir de pedúnculos de
inflorescências de *Cattleya* White Dream**

Resumo

O cultivo *in vitro* de pedúnculo de inflorescência pode ser um importante tipo de explante para algumas espécies de orquídea, por estar disponível em quantidade e não comprometer o desenvolvimento da planta-matriz. O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade morfogênica de pedúnculo de inflorescência de *Cattleya* White Dream. Espatas fechadas envolvendo as inflorescências foram retiradas de plantas adultas e, após desinfestação, retiraram-se as inflorescências com os pedúnculos, desinfestando-se novamente e fazendo cortes transversais nos pedúnculos, formando discos de aproximadamente 1 mm. Estes explantes foram inoculados em meio de cultivo líquido com a formulação de Murashige & Skoog (1962), modificada à metade da concentração do ferro, acrescentado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. A este meio basal foram adicionadas diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético): 0,0; 3,0; 10,0; 30,0; e 100,0 mg L⁻¹, as quais constituíram os cinco tratamentos, com 10 repetições, sendo dois discos do segmento de pedúnculo por tubo de ensaio. Os tubos de ensaio foram colocados na sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 2 °C, em um agitador rotatório inclinado, a 3 rpm, no escuro. Após 139 dias de cultivo, não se observou nenhuma resposta morfogênica dos explantes. Estes se mostravam completamente oxidados e com o carvão ativado aderido às suas superfícies.

Palavras-chave: orquídea, cultura de tecido, morfogênese.

Introdução

Vários híbridos de orquídeas são propagados por meio de diferentes métodos de cultura de tecidos. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para avaliar as inflorescências e partes adjacentes de orquídeas simpodiais como fonte de explantes (Santana & Chaparro, 1999). Segundo estes mesmos autores, estes tipos de explantes apresentam algumas vantagens em relação ao uso de gemas terminais e axilares, como, obtenção em grande número, baixa contaminação, elevada porcentagem de formação de protocormóides e maior rapidez do processo.

Arditti & Ernst (1992) relatam que as primeiras espécies de orquídeas em que gemas juvenis de flores ou de inflorescências foram cultivadas possuíam hábito de crescimento monopodial, como as do gênero *Ascofinetia*, *Neostylis* e *Vascostylis* (Intuwong & Sagawa, 1973), seguidas mais tarde das espécies do gênero *Phalaenopsis* (Rotor, 1949), *Phragmipedium* (Fast, 1980) e *Cymbidium* (Kim & Kako, 1984). Segundo estes autores, as espécies que apresentam crescimento monopodial têm desenvolvimento e sobrevivência comprometidos quando se utilizam ápices caulinares ou gemas axilares como explantes para a propagação clonal *in vitro*.

Para espécies do gênero *Phalaenopsis*, as gemas laterais de hastes de inflorescências em estágio inicial de desenvolvimento, antes da antese das primeiras flores, são muito utilizadas como explantes (Vacin & Went, 1949; Intuwong *et al.*, 1972; Ball *et al.*, 1974-75; Reisinger *et al.*, 1976; Arditti *et al.*, 1977; e Ernst, 1984, citados por Arditti & Ernst, 1992). Para o gênero *Oncidium*, Chen & Chang (2000) citam trabalhos (Fast, 1973, Kerbauy, 1984, Nuraini & Shaib, 1992) que utilizam como explantes extremidades de hastes florais, microinflorescências e gemas de hastes florais, para obtenção de protocormóides e plântulas.

Lin (1986), citado por Arditti e Ernst (1992), relatou a multiplicação clonal de *Phalaenopsis* obtida de cultivo de discos de segmentos internodais da haste floral, em estágio inicial do desenvolvimento, em meio sólido de minerais

nutrientes de Vacin & Went (1949), acrescido de 1,0 e 5,0 mg.L⁻¹ de BAP, sem auxina. Obteve elevada produção de protocormóides, que poderiam dar origem às plântulas.

Santana & Chaparro (1999) estudaram a propagação clonal do híbrido de *Oncidium* Gower ramcey utilizando gemas florais como explantes, cultivadas em meio de Knudson C (1946) modificado, para induzir a formação de protocormóides. Estes eram, posteriormente, subcultivados em meio líquido contendo minerais nutrientes de MS (1962) e diferentes concentrações de ANA e BAP, visando sua multiplicação e formação de plantas. A melhor diferenciação de gemas florais em protocormóides ocorreu em meio de cultivo contendo polpa de banana verde e suco de abacaxi. A multiplicação foi mais efetiva em meio com 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Meio de cultivo sem hormônio não induziu formação de protocormóides; porém, com 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 10 mg L⁻¹ de BAP, houve anormalidades.

Para o gênero *Cattleya*, não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que utilizassem inflorescências ou parte delas para a propagação *in vitro*. Este tipo de explante pode ser testado como uma alternativa para se produzirem plantas homogêneas, mantendo as características florais desejáveis da espécie ou híbrido, além de não prejudicar o crescimento, o desenvolvimento e a arquitetura normais das referidas plantas-matrizes.

Neste trabalho, utilizaram-se segmentos de pedúnculos de inflorescência do híbrido *Cattleya* White Dream, objetivando verificar a capacidade morfogênica desse explante, cuja formação de novas estruturas poderiam ser empregadas para o desenvolvimento de plântulas.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

1. Origem e tipo de explantes

Os explantes foram extraídos de plantas adultas do híbrido *Cattleya* White Dream, cultivadas em casa de vegetação, no município de Patos de Minas. Foram extraídas as espatas ainda fechadas, as quais envolviam as inflorescências.

Foram utilizados, como explantes, discos de aproximadamente 1 mm de comprimento. Estes discos foram extraídos da porção compreendida entre a base do pedúnculo da inflorescência e a base do ovário, medindo aproximadamente 3 a 5 cm de comprimento.

2. Desinfestação e preparação dos explantes

As espatas fechadas, retiradas das plantas-matrizes, inicialmente foram tratadas com solução de detergente neutro para laboratório 50 % v/v (Vetec®) por 5 minutos, seguido da enxaguadura com água desionizada estéril e autoclavada até a retirada de todo o detergente. Em seguida, foram tratadas com álcool 70 % v/v, por 5 minutos. Posteriormente, sob condições de câmara de fluxo laminar, as espatas foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2 % v/v (água sanitária comercial pura), por 20 minutos, e submetidas a quatro enxaguaduras sucessivas com água desionizada estéril nos respectivos tempos: 5; 10; 10; e 10 minutos. Durante todo o processo de desinfestação, os frascos que continham o material imerso nas soluções desinfestantes e também na água foram agitados manualmente, em intervalos periódicos.

Após a desinfestação, ainda sob condições de câmara de fluxo laminar, as espatas foram retiradas com o auxílio de pinça e bisturi de aço inoxidável. Em seguida, as inflorescências com os pedúnculos foram imersos por alguns

segundos em álcool 70 % v/v, em hipoclorito de sódio 0,2 % v/v (produto comercial) e colocados em placa de petri contendo água de coco natural filtrada (filtro de poro 22 µm). Os discos de explantes foram excisados dos pedúnculos, em cortes transversais, e permaneceram imersos em água de coco natural por um período de uma hora, para evitar efeitos prejudiciais da exsudação fenólica dos explantes.

Posteriormente, os explantes foram transferidos para o meio de cultivo.

3. Composição, preparação e distribuição dos meios nos frascos de cultivo

O meio utilizado para cultivo dos explantes constituiu-se dos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado em relação à concentração do ferro, utilizando-se a metade da concentração original (27,8 mg L⁻¹ de sulfato de ferro). Ao meio de cultivo, foram ainda adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 50 mL L⁻¹ de água de coco natural e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. A este meio basal foram adicionadas diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético): 0,0; 3,0; 10,0; 30,0; e 100,0 mg L⁻¹, as quais constituíram os tratamentos.

Os meios de cultivo tiveram o pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, sendo posteriormente distribuídos 10 mL de meio em tubos de ensaio, com dimensões de 25 x 150 mm, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 30 minutos. Após a distribuição dos meios, os tubos de ensaios foram fechados com tampa transparente de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®). A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

4. Inoculação dos explantes nos frascos de cultivo

Após a esterilização e sob condições de câmara de fluxo laminar, foram inoculados no meio de cultivo dois discos de pedúnculo floral em cada tubo de ensaio, cuja temperatura do meio equivalia-se à do ambiente.

Depois da inoculação dos explantes, os tubos foram novamente fechados com tampas transparentes de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

5. Condições de incubação

Os tubos de ensaio foram colocados na sala de cultivo, à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação orbital de aproximadamente 3 rpm em um agitador rotatório inclinado. Os explantes foram incubados no escuro, por 139 dias.

6. Características avaliadas e análise estatística

Para analisar a capacidade morfogênica dos explantes de pedúnculos de inflorescências dessa espécie, avaliaram-se, a partir de cada explante, a taxa de sobrevivência, o estado de oxidação e a formação de calos.

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos as cinco concentrações de 2,4-D (0,0; 3,0; 10,0; 30,0; e 100,0 mg L⁻¹), com 10 repetições. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio contendo dois explantes, totalizando 20 explantes por tratamento.

Os dados visuais observados foram analisados descritivamente.

Resultados e discussão

Após 139 dias de cultivo, sem renovação do meio, observou-se que os explantes, em sua totalidade, apresentavam completamente oxidados e com taxa de 100 % de mortalidade. Portanto, não se obteve êxito neste experimento.

Quando se utilizam plantas provenientes do campo ou de casa de vegetação, é necessária uma desinfestação eficiente do material propagativo para se obterem explantes axênicos, porém, sem conduzi-los à morte, quando do seu preparo (Leifert *et al.*, 1994). O método de desinfestação neste trabalho foi eficiente, pois não ocorreu contaminação no meio de cultivo, que permaneceu límpido durante o período de incubação. Porém, o tamanho e a espessura reduzidos dos explantes, assim como o tempo de contato com os agentes desinfestantes, podem ter sido prejudiciais à sobrevivência destes.

O carvão ativado utilizado pode não ter sido, de todo, eficiente. Segundo George (1993), o carvão exerce as seguintes funções no meio de cultivo: escurece o meio, impedindo a incidência de luz na base do explante, promovendo, portanto, o enraizamento, e adsorve os compostos tóxicos formados durante a oxidação dos compostos fenólicos, podendo adsorver, ainda, grande parte dos fitorreguladores hormonais incorporados ao meio de cultivo. Deve-se considerar que o carvão dificulta a detecção de contaminação por bactéria e, além disso, pode mascarar uma oxidação intensa que compromete o desenvolvimento dos explantes. Isto poderia explicar, em parte, a oxidação completa dos explantes, pois o carvão ficou aderido a eles, apresentando, dessa forma, função contrária, de modo a evitar que as substâncias fenólicas se difundissem no meio de cultivo. Pode também ter ocorrido em consequência da baixa rotação do agitador (3 rpm), não mantendo o carvão em suspensão.

Outro motivo provável para os explantes não apresentarem respostas morfogênicas deveu-se à competência e ao grau de diferenciação das células do pedúnculo das inflorescências, as quais poderiam já estar diferenciadas.

Como relatado por Kerbauy (1998), certas respostas específicas de diferentes partes da planta são determinadas pela competência das células-alvo, de tal forma que os fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo por si só não controlam o padrão de diferenciação celular. Entendendo-se como diferenciação o processo mediante o qual as células tornam-se progressivamente especializadas tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Embora não se conheça ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos morfogênicos *in vitro* são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que estas diferentes expressões morfogenéticas se reflitam, de alguma forma, na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos.

Trabalhos futuros deverão ser realizados para determinar como as inflorescências e partes adjacentes podem contribuir para a propagação *in vitro* de planta do grupo das *Cattleya*, determinando a idade fisiológica, composição do meio de cultivo e o balanço hormonal adequados.

Conclusão

Para o híbrido *Cattleya* White Dream, discos de pedúnculos de inflorescências não apresentaram respostas morfogênicas, segundo os procedimentos experimentais adotados.

Referência bibliográfica

- ADELBERG, J.W.; DESAMERO, N.V.; HALE, S.A. & YOUNG, R.E. Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48:1-7, 1997.
- ARANDA. Aranda Orquídeas. Apresenta catálogo de compras. Disponível em: <<http://www.avirtualcom.br>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2002.
- ARAUJO, D. Brazilian orchids – Generalidades, usos e curiosidades. Disponível em: <<http://www.delfinadearaujo.com/generali/genebr.htm>> Acesso em: 13 de fevereiro de 2002.
- ARDITTI, J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture – A manual. In:_____. *Orchid biology: Reviews and perspectives*. 1ª ed. N. Y., Ithaca, Cornell Univ. Press., 1977. p.203-293.
- ARDITTI, J. *Fundamentals of orchids biology*. 1ª ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, Inc., 1992. 691p.
- ARDITTI, J. *Orchid biology: Reviews and perspectives*. 1ª ed. New York, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press, 1977. 310p.
- ARDITTI, J & ERNST, R. *Micropropagation of orchids*. 1ª ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, Inc., 1992. 682p.
- ARDITTI, J. & KRIKORIAN, A.D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122:183-241, 1996.
- BALL, E.A.; ARDITTI, J.; CHURCHILL, M.E. Clonal propagation of orchids from leaf tips. *Orchid Review*, 79:281-288. 1971.
- BAÑERAS, J.C. Tecnologia em floricultura tropical. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 3 (2):5-9, 1997.
- BLACK, P.McK. *Orquídeas*. 1ª ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Livro Técnico S/A. Rio de Janeiro. 1973. 128p.
- BRITO, A.; CARLOS, R.F.; TEIXEIRAS, P. Pirataria inibe aumento das exportações de flores. *Gazeta Mercantil*, São Paulo, 5 nov. 2001. *Finanças & Mercados, Agribusiness*. p. B-14.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª ed. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v.1. 1998. p.87-132.
- CARNEIRO, M.F.; CARNEIRO, I.F.; OLIVEIRA, S.A.; LEITE JÚNIOR, C.B.; PACHECO, R.A.; SOUZA, M.M.; RAMOS, T.V. Bromélias e orquídeas na região dos Cerrados - Dados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 13º, São Paulo, 2001. Anais, São Paulo, Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2001, p.13
- CARVALHO, V.S. Morfogênese *in vitro* em orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa-Minas Gerais: UFV, 2002. 164p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, 4 (1/2):1-46, 1998.
- CHEN, J.T. & CHANG, W.C. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62:95-100, 2000.
- CHURCHILL, M.E.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. Tissue culture of orchids. I – Methods for leaf tips. New Phytol, 72:161-166, 1973.
- COLLIN, H.A. & EDWARDS, S. Initiation of callus cultures. In: _____. Plant cell culture.UK, Bios Scientific Publishers Ltda, 1998. p.27-34.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. 1º ed. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- DADZIE, B.K. & ORCHARD, J.E. Post harvest criteria and methods for routine screening of banana. Plantain hybrids. 1ª ed. Inibap Headquarters, Montpellier, 1996. 64p.
- DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation: Technology and application. In: _____ Micropropagation. 2ª ed. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers, 1993. p.1-13.
- DIAS, J.M.M. Organogenesis *in vitro* en segmentos de epicotilo de citrange troyer. Valência-Espanha, 1998. 317p. Tese (Doutorado) - Universidad Politécnica de Valencia, 1998.
- DÖRNENBURG, H. & KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. Critical Reviews in Plant Sciences, 15(2):141-168, 1996.

- DRESSLER, R.L. Phylogeny and classification of the Orchid family. 1^a ed. Portland, Oregon. Dioscorides Press, 1993. 314p.
- DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; RESENDE, R.O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1^a ed. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v.1. 1998. p.45-67.
- EIGELDINGER, O. & MURPHY, L.S. Cattleya. In:_____ Orchids – A complete guide to cultivation. 1^a ed. London, John Gifford Ltda, 1972. p.154-167.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. Tradução: Berta Lange de Morretes. 1^a ed. São Paulo, Edgar Blücher, 1976. 293p.
- FARIAS, L.A. & RIBEIRO, R. Pôster Apresenta orquídeas na Mata Atlântica. Revista O Mundo das Orquídeas, 13:43-45. 2000.
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1^a ed. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v.1. 1998. p.21-43.
- FUNK, C. & BRODELIUS, P.E. Phenyl-propanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. II. Effects of precursor feeding and metabolic inhibitors. Plant Physiol, 94:95-101, 1990.
- GEORGE, E.F. Equipment and procedures. In:_____. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology. 2^a ed. Basingstoke, Exegetics Limited, 1993. p.95-129.
- GEORGE, E.F. Plant growth regulators. In:_____. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology. 2^a ed. Basingstoke, Exegetics Limited, 1993. p.420-479.
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Progress in micropropagation. In:_____. Plant propagation by tissue culture. 1^a ed. Basingstoke, Exegetics Ltd., 1984. p.412-424.
- GEORGE, M.W. & TRIPEPI, R.R. Plant preservative mixture (TM) can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, European birch, and rhododendron. Hortiscience, 36 (4):768-769, 2001.
- GLOEDEN, H. A Jóia da Bruxa e outras histórias de orquídeas e orquidófilos. 1^a ed. São Paulo, SP, Ativa, 1998. 170p.

- GOVIL, S. & GUPTA, S.C. Commercialization of plant tissue culture in India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:65-73, 1997.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ª ed. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v.1. 1998. p.183-260.
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annual Sciences Botanic Biology Vegetable*, 14:1-223. 1953.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, University of California, Berkeley Circular 347. 1950.
- IBRAFLOR. Programa brasileiro de exportação de flores e plantas. Instituto Brasileiro de Floricultura. Apresenta informações gerais. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>> Acesso em: 17 de novembro de 2001
- ISHII, M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. *Acta Horticulturae*, 36:229-233, 1974.
- ISHII, M.; UEMOTO, S.; FUJIEDA, K.; NONAKA, M.; SHOYAMA, Y.; MIYAHARA, Y.; NISHIOKA, I. A new biologically active phenolic from *Cattleya trianaei*. *Phytochemistry*, 18:1211-1213, 1979.
- ISI. Plant preservative mixture (TM). Institute for scientific information. Disponível em: <<http://www.ppm4plant-tc.com/ppm.htm>> Acesso em: 08 de setembro de 2001.
- JOLY, A.B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 10ª ed. São Paulo, Nacional, 1991. 777p.
- KÄMPF, A.N. A floricultura brasileira em números. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 3(1):1-7, 1997.
- KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ª ed. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, v.2. 1998. p.161-181.
- KERBAUY, G.B. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip into protocorm-like bodies. *Journal of Plant Physiology*, 138:248-251, 1991.
- KONONOWICZ, H. & JANICK, J. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*. *HortScience*, 19:58-59, 1984.

- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 14:214-217, 1946.
- LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants; Reasons for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences, 13(2):139-183, 1994.
- LINDEMANN, E.G.P.; GUNCKEL, J.E.; DAVIDSON, O.W. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin, 39:100-127, 1970.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, 18:100-127, 1965.
- MARTINS, F.M. & WIDHOLZER, C. F.N. Morfo-anatomia foliar de *Campylocentrum aromaticum* B. Rodr. (Orchidaceae). In: ENCONTRO DE BOTÂNICOS. BIOPROSPECÇÃO. ALTERNATIVAS PARA O NOVO MILÊNIO, XXIII, Minas Gerais, 2001. Anais, Universidade Federal de Viçosa, 2001, p.140.
- MAURO, M.; SABAPATHI, D.; SMITH, R. Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. Lindleyana, 9(3):169-173, 1994.
- MENEZES, L.C. *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas brasileiras. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112 p.
- MENEZES, L. C. *Laelia purpurata*. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura. 1995. 143p.
- MOREL, G. Neues auf dem Gebiet der Meristem-Forschung. Die Orchidee, 20: 433-443, 1970.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology, 25:135-166, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497, 1962.
- PERES, L.E.P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G.R.; MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum frimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. J. Plant Physiol, 155:551-555, 1999.

- PERES, L.E.P. & KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinins ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum frimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell Reports, 18:1002-1006, 1999.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- PIERIK, R.L. M. & STEEGMANS, H.H.M. The effect of 6-benzylamino purine on growth and development of *Cattleya* seedlings grown from unripe seeds. Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie, 68:228-234, 1972.
- PRAKASH, L.; LEE, C.L.; GOH, C.J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel approach – Thin section culture. Journal of Orchid Society India, 10(1-2):31-41, 1996.
- PRAKASH, L.; LOH, C.S.; GOH, C.J. An *in vitro* method for rapid regeneration of monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. Plant Cell Reports, 14: 510-514, 1995.
- READ, P.E. & SZENDRÁK, E. Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. Acta Horticulturae, 461(2):93-103, 1998.
- REINERT, R.A. & MOHR, H.C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. American Society for Horticultural Science, 91:664-671, 1967.
- RIBEIRO, R. Exportação: uma boa opção para produtores brasileiros. Revista O Mundo das Orquídeas, 3(10):40-41, 2000.
- SANTANA, G.E. & CHAPARRO, K. Clonal propagation of *Oncidium* through the culture of floral buds. Acta Horticulturae, 482:315-320, 1999.
- SHEEHAN, T.J. Orchids. In: Larson, R.A., ed. Introduction to floriculture. 2ª ed. San Diego, Academic Press, 1992. p.13-142.
- SKOOG, F. & MILLER, C. The biological action of growth substances. Symposium Society Experience. Biology, 11:118-131, 1957.
- SKOOG, F & TSUI, C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. American Journal of Botany, 35: 782-787, 1948.
- STOLTZ, L.P. Iron nutrition of *Cattleya* orchid grown *in vitro*. Journal American Society of Horticultural Sciences, 104 (3):308-310, 1979.

- SUTTLEWORTH, F.S., ZIM, H. S.E; DILLON, G.W. Orquídeas. Guia dos orquidófilos. 7^a ed. Rio de Janeiro, Expressão e cultura, 1997. 158p.
- THORPE, T. A. & HARRY, I. S. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae*, 447: 39-49, 1997.
- VACIN, E. & WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solution. *Bot. Gaz*, 110:605-613. 1949.
- WALT, V. Mercado das Flores – da estufa ao vaso, um longo caminho. *National Geographic, Brasil*, 1 (12): 96-113, 2001.
- WATANABE, D. Lista de híbridos. Disponível em: <http://www.biorchids.com.br/Lista_2002.htm> Acesso em: 13 de fevereiro de 2002.
- WESTCOOT, R.J.; CHEETHAM, P.S.J.; BARRACLOUGH, A.J. Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. *Phytochemistry*, 35:135-138, 1994.
- YEW, C. K. NG; HEW, C. S. Orchid pseudobulbs – ‘false’ bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! *Scientia Horticulturae*, 83:165-172, 2000.