

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE
ORQUÍDEAS: CARACTERÍSTICAS
MORFOFISIOLÓGICAS**

JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES

2009

JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS:
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia da Propagação Sexuada e Assexuada de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Soares, Joyce Dória Rodrigues

Silício na micropropagação de orquídeas: características morfofisiológicas. / Joyce Dória Rodrigues Soares. – Lavras : UFLA, 2009.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Orchidaceae*. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3. Silício. 4. Anatomia. 5. Ambientes de cultivo. 6. Estiolamento *in vitro* I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.4

JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS:
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia da Propagação Sexuada e Assexuada de Plantas para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de julho de 2009

Prof. Dr. Janice Guedes de Carvalho DCS/UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro DBI/UFLA

Pesq. Dr. Aparecida Gomes de Araujo DAG/UFLA

Prof. Dr Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, que sempre me guardou e me mostrou como ter a verdadeira
felicidade.

A meu marido Charles e meus filhos Maria Eduarda e Arthur.

A minha mãe Miriam e meus avós João e Rita.

Aos meus irmãos Rafael e Serginho e a minha sobrinha Michelle.

DEDICO

Tudo quanto fizerdes, fazeis de
todo coração, como para o Senhor, e não para
os homens, sabendo que do senhor recebereis
como recompensa a herança; servi a Cristo, o
Senhor. Co 3, 23-24.

BIOGRAFIA

JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES, filha de André Luiz Rodrigues (falecido) e Miriam Dória Sousa Rodrigues, nasceu em 29 de abril de 1982, no município de Araçuaí, estado de Minas Gerais. Coursou até a oitava série na cidade de Coronel Murta, mudou-se para Betim (MG), onde concluiu o ensino médio, e, na cidade de Lavras, obteve o título de Engenheira Agrônoma, pela Universidade Federal de Lavras, em julho de 2007.

Sempre esteve envolvida em atividades de pesquisa desde o primeiro período de sua graduação, dedicando tempo aos estudos e à descoberta de inovações científicas. Suas atividades se iniciaram no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas onde, no terceiro período, foi agraciada com bolsa de iniciação científica, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), durante 36 meses, sendo sua monografia de conclusão de curso realizada com espécies de orquídeas.

Em agosto de 2007, iniciou o Mestrado em Agronomia (área de concentração Fisiologia Vegetal), na Universidade Federal de Lavras, sendo aprovada no Doutorado pela mesma Instituição em junho de 2009 e tendo defendido a dissertação em 18 de julho de 2009.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois hoje enxergo que Ele sempre teve um plano na minha vida. Ele me trouxe aqui pra essa cidade onde vivi e vivo os melhores momentos de minha vida. Conheci-O de verdade e também pessoas que eu sempre lembrarei com muito carinho e saudade.

Ao meu marido Charles e meus filhos Maria Eduarda e Arthur, que sempre estiveram a meu lado com carinho e amor. Vocês são os amores da minha vida.

À minha mãe que me deu o apoio inicial aos meus estudos e hoje mesmo longe não me deixa sozinha, meu eterno amor e gratidão.

Aos meus irmãos Rafael e Serginho, e a minha sobrinha Michelle que sempre me ajudaram com a Maria Eduarda e estiveram ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Moacir Pasqual, pessoa sem igual, de uma alegria admirável e, principalmente, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e presteza, incondicionais, demonstrados e repassados, meus sinceros agradecimentos.

A minha avó Rita e meu avô João pela proteção constante, por todas as grandes e pequenas oportunidades, pelo carinho, dedicação e confiança repassados durante toda a minha vida, meu eterno amor e gratidão.

À CAPES pela concessão de bolsas de estudos para o mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, instituição na qual obtive a base acadêmica que será parte integrante e fundamental para minha vida.

Ao meu companheiro de estudos e trabalhos, mas, sobretudo, ao meu amigo Filipe, pela prestatividade e amizade de sempre, pela paciência nos momentos de estresse e cansaço.

À pesquisadora Aparecida Gomes de Araujo (Cida), que desde a minha graduação, sempre me auxiliou muito no meu crescimento científico, meu muito obrigado.

Aos amigos do laboratório, doutorandos, mestrandos e iniciação científica, em especial a Claudinéia (Néia), Dalíhia e Fran, que com certeza são muito especiais pra todos nós, pela amizade e ajuda na realização dos trabalhos, muito obrigada mesmo.

À ‘família’ do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, na pessoa de Vantuil, Claret e Antônio Carlos, profissionais extremamente capazes, dedicados e prestativos, meu muito obrigado.

A minha segunda mãe, líder e amiga, Rosane Freitas Schwan, que nem imagina o quanto é importante pra mim. Eu te amo muito.

A toda minha família de “Ultra Jovens”, que estiveram a meu lado e me ensinaram a ser uma pessoa melhor.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: Qualidade de luz e silício no crescimento <i>in vitro</i> de espécies nativa e híbrida de orquídeas.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	03
1 Introdução.....	04
2 Material e métodos.....	06
3 Resultados e discussão.....	09
4 Conclusões.....	19
5 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2: Anatomia foliar de espécies híbrida e nativa de orquídeas micropropagadas sob diferentes concentrações de silício.....	24
Resumo.....	25
Abstract.....	26
1 Introdução.....	27
2 Material e métodos.....	29
3 Resultados e discussão.....	32
4 Conclusões.....	45
5 Referências bibliográficas.....	46
CAPÍTULO 3: Estiolamento e luz artificial influenciando a brotação e crescimento <i>in vitro</i> de espécies nativa e híbrida de orquídeas	50
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1 Introdução.....	53

2 Material e métodos.....	55
3 Resultados e discussão.....	57
4 Conclusões.....	66
5 Referências Bibliográficas.....	67

RESUMO

SOARES, Joyce Dória Rodrigues. **Silício na micropropagação de orquídeas: características morfofisiológicas.** 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O cultivo *in vitro* de espécies de orquídeas constitui a base para a propagação massal de mudas livre de doenças. Este trabalho objetivou estudar o desenvolvimento fitotécnico, o comportamento fisiológico e ultraestrutural em orquídeas micropropagadas. Três experimentos foram realizados, os quais avaliaram: 1) concentrações de silício e qualidade de luz no cultivo *in vitro*; 2) anatomia de espécies híbrida e nativa sob concentrações de silício; 3) estiolamento e luz artificial na multiplicação *in vitro* de orquídeas. O material vegetal consistiu de plântulas obtidas através de germinação *in vitro*, após 3 meses de estabelecimento. Como meio de cultura básico, utilizou-se o MS, acrescido de carvão ativado (2 g L^{-1}) e ágar ($5,5 \text{ g l}^{-1}$) como agente geleificante. Verificou-se que maior crescimento foi obtido com a utilização de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio para a espécie híbrida e nativa, respectivamente. O silício pode contribuir de forma significativa para o correto desenvolvimento da estrutura interna das folhas de orquídeas, sendo que a ausência desse nutriente promoveu menor desenvolvimento das plantas em comparação com as plantas de meios de cultura contendo silício. O ambiente de luz artificial promoveu um maior crescimento das plantas em comparação com as de ambiente natural. Em relação à multiplicação de orquídeas foram obtidos maiores resultados para as duas espécies em condições de estiolamento independente do fitorregulador utilizado. Para a espécie nativa (*Laelia crispata*) maior número de brotos e de internós foram obtidos com a utilização de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA na ausência de BAP. Em relação à espécie híbrida [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], maior número de brotos foi obtido com a utilização de $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP na ausência de ANA. Para a obtenção de maior número internos utilizou-se $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA.

Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador), Aparecida
Gomes de Araujo - UFLA

ABSTRACT

SOARES, Joyce Dória Rodrigues. **Silicon in the micropropagation of orchids: morphophysiological characteristics.** 2009. 66 p. Dissertation (Master Program in Biology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The *in vitro* cultivation orchids species is the basis for mass propagation of seedlings free of disease. This study investigated the development fitotecnic, the physiological development and ultrastructural in micropropagated orchids. Three experiments were conducted, which assessed: 1) concentrations of silicon and quality of light in the *in vitro* culture; 2) anatomy of hybrid and native species in silicon concentrations; 3) etiolation and artificial light in the *in vitro* multiplication of orchids. The plant material consisted of seedlings obtained by germination *in vitro*, after 3 months of establishment. As a basic culture, using the MS activated charcoal (2 g L⁻¹) and agar (5.5 g l⁻¹) as a geleificante. It was found that higher growth was obtained with the use of 2.0 mg L⁻¹ and 1.0 mg L⁻¹ of calcium silicate for hybrid and native species, respectively. The silicon can contribute significantly to the proper development of the internal structure of the leaves of orchids, and the absence of nutrients promoted development of plants in comparison with the plants of culture media containing silicon. The environment of artificial light promoted greater plant growth compared with the natural environment. In relation to the multiplication of orchids were higher results for the two species under conditions of etiolation independent of phytohormone used. For the native species (*Laelia crispata*) higher number of shoots and internodes were obtained using 2.0 mgL⁻¹ of NAA in the absence of the species hybrid BAP. In relation to the hybrid species *Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], greater number of shoots was obtained with the use of 4.0 mgL⁻¹ BAP in the absence of ANA. To obtain more internal use is 2.0 mgL⁻¹ NAA.

Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Aparecida Gomes de Araujo - UFLA

CAPÍTULO 1

QUALIDADE DE LUZ E SILÍCIO NO CRESCIMENTO IN VITRO DE ESPÉCIES NATIVA E HÍBRIDA DE ORQUÍDEAS

**Joyce Dória Rodrigues Soares, Filipe Almendagna Rodrigues, Aparecida
Gomes de Araujo, Moacir Pasqual, Roseneide Rocha dos Santos**

RESUMO

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecidos pode ser um valioso instrumento na produção de mudas de orquídea. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de silicato de cálcio e a qualidade de luz que proporcione melhor crescimento em plântulas de orquídea nativa (*Brassavola perrine*) e híbrida [*Laelia Cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia Cattleya* Startifire Moon Beach]. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculadas em frascos com capacidade para 250cm³ contendo 60 mL de meio de cultura MS, acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) em ambientes de cultivo [natural (casa de vegetação) e artificial (em sala de crescimento)], em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8±0,1 e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Ao final de 150 dias foram realizadas avaliações biométricas e análises ultraestruturais (microscopia de varredura). Maior crescimento de plântulas foi obtida com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de silicato de cálcio para o híbrido e espécie nativa, respectivamente. As orquídeas em estudo são espécies anfiestomática, com estômatos do tipo tetracítico (híbrida) e anomocítico (nativa). A presença do silício na estrutura foliar proporcionou o correto desenvolvimento de plântulas de orquídeas.

Palavras-chave: microscopia, anatomia vegetal, biometria.

ABSTRACT

The vegetative propagation techniques using tissue culture can be a valuable tool in the production seedlings orchid. The objective of this study was to determine the concentration of calcium silicate and light quality that provides better growth in seedlings of native orchid (*Brassavola Perrine*) and hybrid [(*Laelia Cattleya climax* "Tuilerie" x *Laelia Cattleya Sons Atout Rotunda*) x *Brassolaelia Cattleya Startifire Moon Beach*]. Seedlings from seeds germinated *in vitro* with approximately 0.5 cm long were inoculated in flasks with a capacity of 250cm³ containing 60 mL of culture medium MS, plus calcium silicate (0, 0.5, 1.0 and 2, 0 mg L⁻¹) in environments of culture [natural (a greenhouse) and artificial (in a growth room)] in all possible combinations. The culture medium had its pH adjusted to 5.8 ± 0.1 and solidified with 5.5 g L⁻¹ of the agar before autoclaving at 121 ° C and 1 atm for 20 minutes. At the end of 150 days were evaluated biometrics and ultrastructural analysis (scanning microscopy). Greater growth of seedlings was obtained with the use of 2.0 mg L⁻¹ and 1.0 mg L⁻¹ of calcium silicate for hybrid and native species, respectively. The orchid species in study are anfstomatic with the type tetracytic (hybrid) and anomocytic (native) stomata. The presence of silicon in the leaf structure has the correct development of seedlings of orchids.

Key words: microscopy, plant anatomy, biometrics.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial, devido, principalmente, à grande capacidade de combinação genética e à beleza, forma e cor de suas flores. Dificilmente essas espécies formam sementes na natureza, e, quando formam, apenas 3 a 5% germinam.

A cultura de tecidos se destaca como uma técnica que viabiliza a germinação de sementes possibilitando a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo. As primeiras aplicações da micropropagação na multiplicação e crescimento de espécies do gênero *Orchidaceae* datam da década de 1960. Desde então, houve intensificação nas pesquisas visando diminuição dos custos de produção, obtida através da substituição das lâmpadas fluorescentes utilizadas nas salas de crescimento pela luz natural, e modificações na formulação do meio de cultivo (Rocha et al., 2007). Gastos com iluminação artificial nas salas de cultivo somam, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas (Standaert-de-Metsenaere, 1991).

Efeitos benéficos da luz natural e de modificações na composição nutricional dos meios de cultura foram observados para a micropropagação das cultivares de coqueiro com redução nos custos de produção das mudas (Talavera et al., 2005). Há necessidade de pesquisas que esclareçam efeitos sobre mudas micropropagadas. Modificações na composição do meio de cultivo, como o uso do silício, promovem efeitos benéficos nas plantas, elevando o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando assim a rigidez na parede celular, fazendo com que sejam alcançadas elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (Camargo et al., 2007). A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos como aumento da eficiência da capacidade

fotossintética, redução da transpiração, crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (Zhou, 1995).

Objetivou-se avaliar a influência do ambiente de cultivo e de concentrações de silicato de cálcio no crescimento *in vitro* de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], por meio de análise fitotécnica e ultraestrutural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de março e agosto de 2008, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras.

Material vegetal - Plântulas de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], advindas de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação (nativa) ou polinização cruzada (híbrido) foram utilizadas. As sementes foram germinadas em meio de cultura Knudson C (Knudson, 1946) modificado em $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (de 0,331 para 6,62 mg L^{-1}), H_3BO_3 (de 0,056 para 1,4 mg L^{-1}) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (de 7,5 para 15 mg L^{-1}), onde permaneceram por três meses. Após este período, cada plântula de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foi inoculada em frascos com capacidade para 250 cm^3 contendo 60 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}), pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com 5,5 g L^{-1} de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas sob luz natural (casa de vegetação) e luz artificial (sala de crescimento), em todas as combinações possíveis.

Foram realizados dois experimentos idênticos, sendo um para a espécie nativa e outro para o híbrido.

Caracterização do ambiente de cultivo - **Ambiente artificial:** sala de crescimento com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. **Ambiente natural:** casa de vegetação

com iluminação natural, sombreamento de 70% (Sombrence®), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas, mínimas e médias de 26°C/32°C, 16°C /16°C e 20°C/23°C e níveis de irradiância, máximos, mínimos e médios, de 93,95 W.m⁻²/199,69 W.m⁻², 11,13 W.m⁻²/10,66 W.m⁻² e 49,38 W.m⁻²/99,43W.m⁻², referentes a dias nublados e claros típicos do período de condução do experimento.

Dados referentes à radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos na sala de crescimento e casa de vegetação, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00 horas). Para o ambiente de sala de crescimento, foi feita apenas uma medida da radiação, durante 6 horas, visto tratar-se de ambiente controlado. Para a coleta de dados referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, empregou-se um termo-higrógrafo.

Avaliações fitotécnicas - Ao final de 150 dias avaliou-se número de brotos e folhas, comprimento médio de brotos e da parte aérea e massa seca de plântulas (após secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas, até peso constante).

Características ultraestruturais - Microscopia eletrônica de varredura: Amostras do terço mediano de 3 folhas em 5 plantas foram fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), pós fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) e, em seguida, desidratados em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo então submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como líquido de transição (Robards, 1978). Posteriormente, foram recobertas com ouro (20 nm) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de Alves (2004).

Delineamento experimental e análises estatísticas - O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, tanto no experimento com orquídea nativa (*Brassavola perrine*) quanto para o híbrido [(*Laelia cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach], ambos em esquema fatorial 2x4, sendo dois ambientes (natural e artificial) e 4 concentrações de silicato de cálcio (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), com 12 plântulas por tratamento.

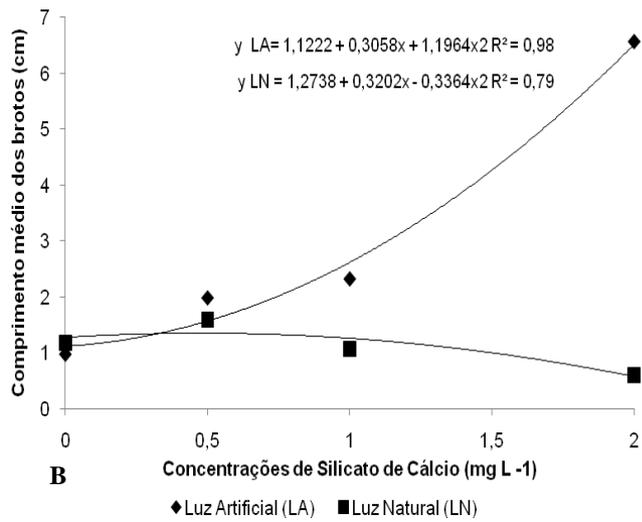
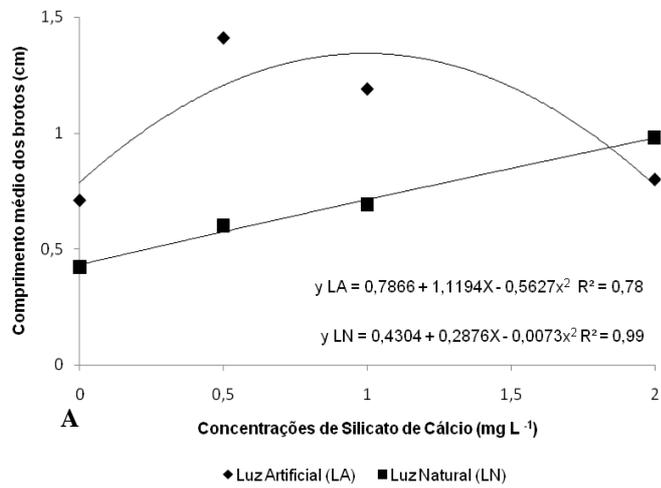
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interação entre os fatores estudados (concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo) foi observada nas variáveis relativas à parte aérea (comprimento médio dos brotos e da parte aérea, número de folhas) e também na massa seca de plântulas de ambas as espécies (Figuras 1 e 2).

Para o comprimento médio dos brotos na espécie híbrido (Figura 1A), a utilização de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio em luz artificial ou sala de crescimento, mostrou maior eficiência (1,34 cm), sendo que a partir desse valor houve decréscimo de forma quadrática no tamanho dos brotos. Já na espécie nativa (Figura 1B), o maior comprimento dos brotos foi obtido com a máxima concentração de silicato de cálcio testada ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), também em sala de crescimento (6,62 cm). Nas duas espécies, o tamanho dos brotos em casa de vegetação foi significativamente menor, sendo que o híbrido apresentou máximo resultado com 2 mg L^{-1} (0,9 cm) e a nativa mostrou maior resultado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio (1,35 cm).

Quanto ao crescimento da parte aérea no híbrido (Figura 1C), o maior resultado foi obtido com a utilização de 2 mg L^{-1} de silicato de cálcio em sala de crescimento (2,84 cm). Já em casa de vegetação, o maior resultado também foi observado com a mesma concentração, porém o comprimento foi significativamente menor (1,9 cm). Para a espécie nativa (Figura 1D), o maior comprimento foi obtido com a utilização de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio, atingindo um máximo de 7,1 cm em luz artificial (sala de crescimento), resultado este que foi superior ao obtido sob condições de luz natural (3,57 cm), mesmo com uma concentração maior de silicato de cálcio ($0,90 \text{ mg L}^{-1}$).



“...continua...”

“FIGURA 1, Cont.”

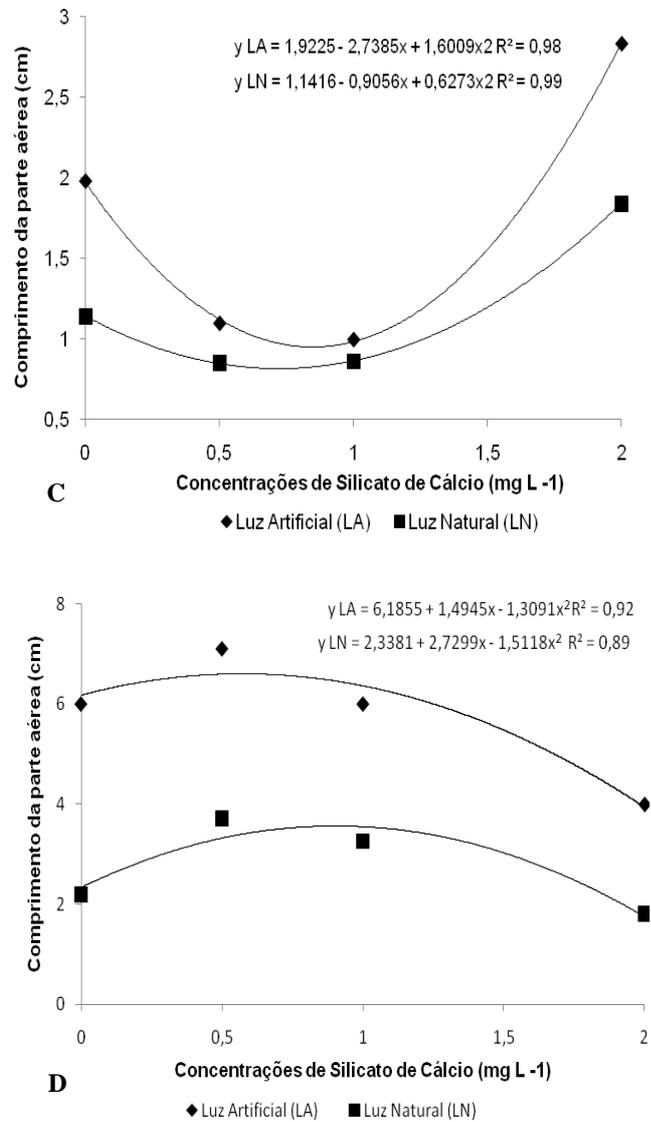


FIGURA 1(A) Comprimento médio dos brotos do híbrido e (B) espécie nativa; (C) Comprimento da parte aérea (cm) do híbrido e (D) espécie nativa de orquídea utilizando diferentes concentrações de silicato de cálcio e em ambientes de cultivo (Luz Artificial e Luz Natural).

Os dados apresentados sugerem os efeitos benéficos da adição de silício ao meio de cultura e também o cultivo de plantas em sala de crescimento (luz artificial), e corroboram resultados obtidos em estudos com *Phalaenopsis* (Zhou, 1995) e *Lycopersicon esculentum* (Romero-Aranda et al., 2006). Tanto para o híbrido, quanto para a espécie nativa, o acréscimo de silicato de cálcio promoveu crescimento da parte aérea dessas plântulas, fato que também foi observado por Zhou (1995), onde o aumento de tamanho das folhas de *Phalaenopsis* foi obtido com a adição de concentrações de 0,1-1,0 mg L⁻¹ de silicato de cálcio ao meio de cultura VW (Vacim & Went, 1949) modificado, e por Romero-Aranda et al. (2006), em que o máximo comprimento das folhas de tomate foi encontrado com concentrações de 0,1-1,0 mg L⁻¹ de silicato de potássio em solução nutritiva de Hoagland.

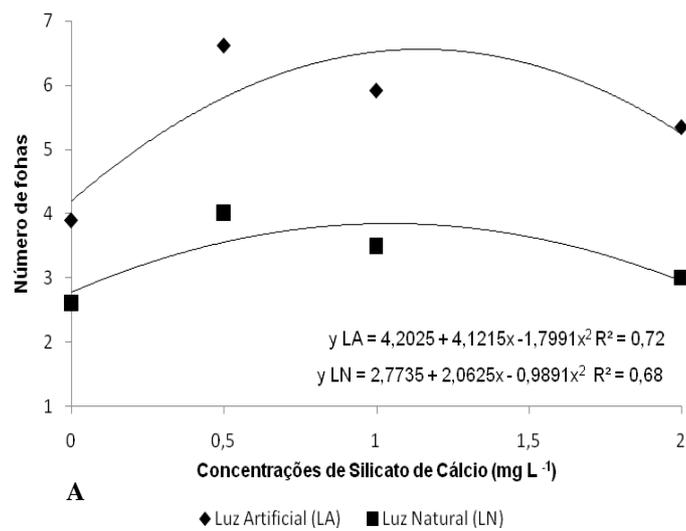
Essa diferença de resultados poderia ser explicada pelo fato de que o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para cada espécie e da perfeita interação de componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais.

Os maiores valores para crescimento de plântulas tratadas com silício (Si) sugerem que, além dos efeitos benéficos do Si em reter água (Trenholm et al., 2004), aumentando assim a eficiência na fase de aclimatização, o mesmo pode estar envolvido no metabolismo da parede celular, melhorando a capacidade das células em expandir, e conseqüentemente, aumentando o dimensionamento da célula (Romero-Aranda et al., 2006).

Analisando-se o número de folhas das duas orquídeas, observa-se um comportamento semelhante. As duas obtiveram melhores resultados na presença de luz artificial, sendo que a orquídea híbrida apresentou maior número de folhas (6,56) com a utilização de 1,1 mg L⁻¹ (Figura 2A) e a espécie nativa (7,72) com a utilização de 0,7 mg L⁻¹ (Figura 2 B). Ambas mostraram decréscimo no número

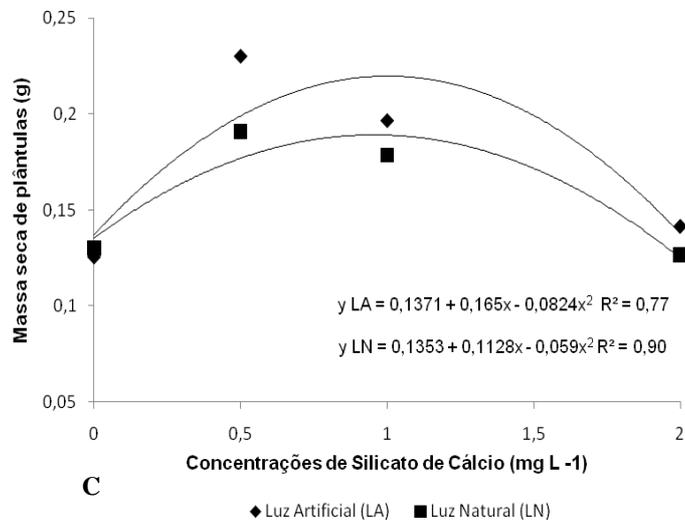
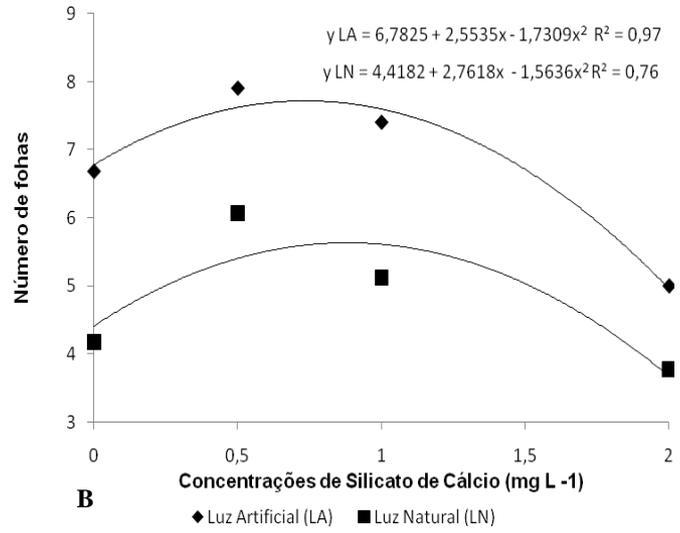
de folhas com o aumento na concentração de silicato de cálcio, provavelmente devido ao fato de que todo nutriente em excesso provoca desbalanço nutricional causado por sua maior concentração na planta ou por interações com outros elementos provocando deficiência ou acúmulo excessivo (Malavolta, 2006).

Comportamento semelhante também foi observado para massa seca de plântulas do híbrido e da espécie nativa, observando-se maior incremento no ambiente de sala de crescimento (LA) acrescido de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio, onde obteve-se $0,22\text{g}$ para o híbrido (Figura 2C) e $0,0438\text{g}$ para a espécie nativa (Figura 2D).



“...continua...”

“FIGURA 2, Cont.”



“...continua...”

“FIGURA 2, Cont.”

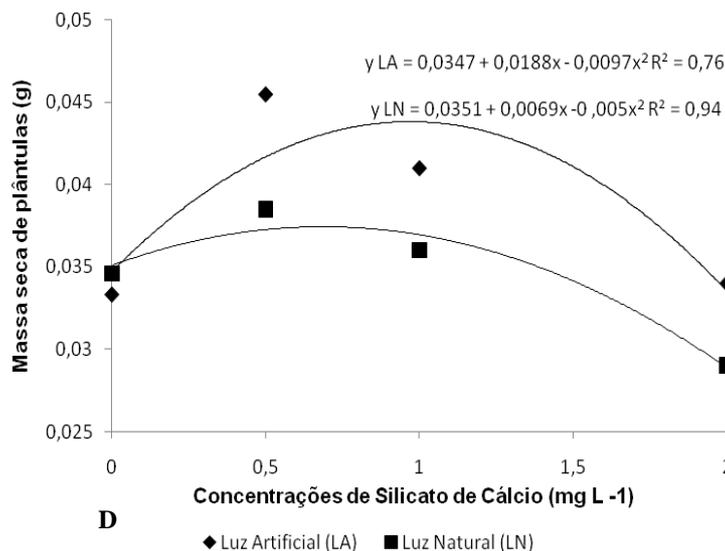


FIGURA 2 (A) Número de folhas - híbrido e (B) espécie nativa; (C) Matéria seca de plântulas (g) - híbrido e (D) espécie nativa em diferentes concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo (Luz Artificial e Luz Natural).

Os dados positivos para número de folhas e massa seca de plântulas concordam com resultados encontrados por Silva (2007) que, trabalhando com gérbera (*Gerbera jamesonii*), verificou maior número de folhas utilizando silicato de cálcio (CaSiO_3) em relação às demais fontes de silício, indicando que este elemento é absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea, onde desempenha papéis fisiológicos e estruturais na anatomia da folha (Barros et al., 2002).

De modo semelhante, Romero-Aranda et al. (2006) evidenciaram maior massa de plântulas de tomate com a utilização de silicato de potássio e de cloreto

de sódio. Trabalhando com orquídea, Zhou (1995) também constatou incremento em massa com a utilização de silicato de cálcio.

O silício tende a acumular-se nas folhas, formando uma barreira protetora e regulando a perda de água da planta por transpiração, auxiliando o processo de aclimatização das plantas micropropagadas. Ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro*, a principal causa de mortalidade durante esse processo é devido à perda de água, pela baixa funcionalidade dos estômatos e camada delgada de cera epicuticular.

Nas superfícies adaxial e abaxial (folha anfiestomática) foi verificada a presença de estômatos do tipo tetracítico tanto no híbrido quanto na espécie nativa (Figura 3), sendo que a deposição de cera epicuticular foi visualizada nas duas epidermes das folhas de orquídea submetidas a tratamento com diferentes concentrações de silício, em relação ao tratamento controle (ausência de CaSiO_3) (Figura 4). A deposição de cera também foi observada na cultura do morango com a utilização de silicato de sódio por Braga et al. (2009), com isso, evita-se a perda de água pelas células da epiderme. Zanenga-Godoy & Costa (2003) observaram estômatos tetracíticos para quatro espécies do gênero *Cattleya* (nativas do planalto central brasileiro), em ambas as faces da folha, como no presente estudo.

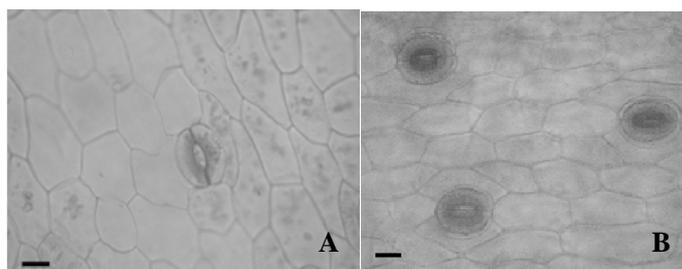


FIGURA 3 Secções paradérmicas de folhas de orquídeas híbrida (A) e nativa (B) Barras= 50 μm .

O tratamento controle, tanto no ambiente de casa de vegetação quanto em sala de crescimento, apresentou deformações na epiderme em relação aos tratamentos que continham concentrações de silício em ambos os ambientes (Figura 4- A, B, C e D). Em algumas espécies da família Orchidaceae, ocorrem células chamadas stegmatas, que são células de morfologia variada, mas, geralmente elipsoides ou arredondadas. Esses stegmatas possuem impregnação de sílica e necessitam desse nutriente para o adequado desenvolvimento anatômico (Piwpuan & Thammathaworn, 2008; Stern & Carlsward, 2008).

Provavelmente, houve deformação das células da epiderme nas plantas dos tratamentos sem silício, pois este nutriente pode se depositar nas paredes celulares dessas células e conferir resistência ao tecido (Piwpuan & Thammathaworn, 2008). Assim, a má formação dessas estruturas pode ter ocasionado deformações estruturais, as quais não se restringem apenas à epiderme, mas possivelmente ao parênquima, devido a um aumento da sinuosidade dessas paredes.

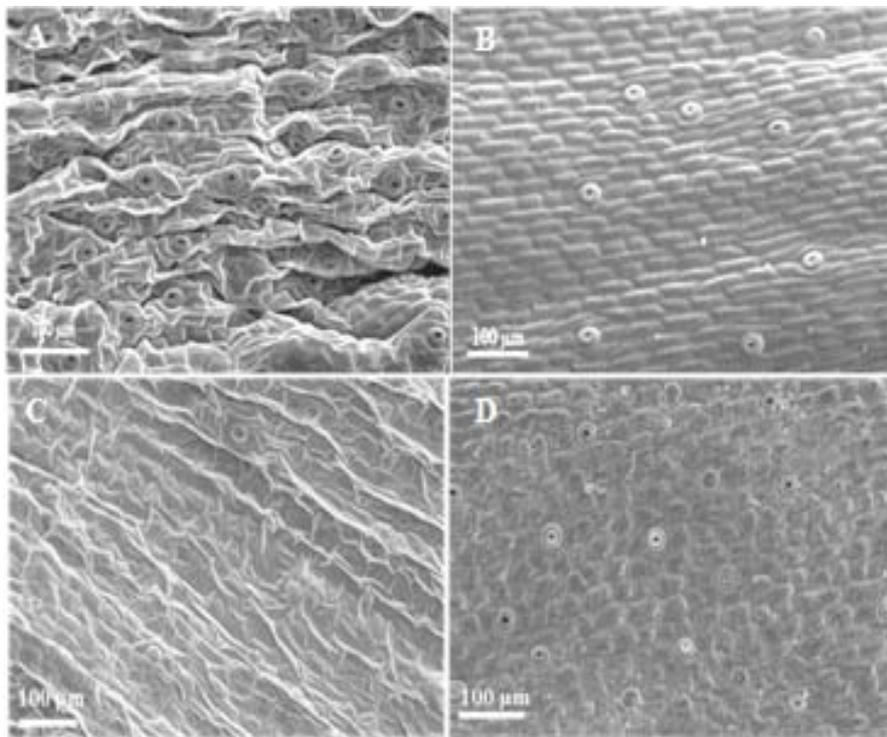


FIGURA 4 Eletromicrografia de folhas de orquídeas submetidas a diferentes concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo: Sala de crescimento e ausência de silicato de cálcio, (A) espécie híbrida e (C) espécie nativa; Sala de crescimento e 2,0 mg L⁻¹ de CaSiO₃ (B) e 0,5 mg L⁻¹ de CaSiO₃.

Na epiderme foliar, o silício combina-se com a celulose, podendo estar presente nas células-guarda dos estômatos e nos tricomas (Silva et al., 2005). Segundo estes autores, o silício também pode ser encontrado nos elementos vasculares. A deposição de silício na parede das células torna a planta mais

resistente à ação de fungos e insetos e evita a perda excessiva de água, diminuindo a taxa de transpiração (Silva, 2007).

De modo geral, informações a respeito das contribuições acerca da estrutura foliar e crescimento das plantas podem contribuir para um melhor entendimento ou mesmo permitir a elucidação de lacunas relativas às diferenças nas taxas de crescimento de plantas (Schluter et al., 2003). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimatização das espécies (Hanba et al., 2002). Assim, a presença do silício no cultivo *in vitro* das espécies estudadas neste trabalho proporcionou benefícios estruturais que fizeram com que a planta mantivesse um correto desenvolvimento. Apesar do tempo de cultivo ter sido relativamente maior, quando comparado a outras espécies de orquideas *in vitro* (Zhou, 1995), a presença desse elemento, possivelmente, conferiu às plantas maior resistência à perda de água, proporcionando o correto arranjo das células da epiderme, sem que houvesse desidratação dos tecidos, que por sua vez prejudicaria o processo de aclimatização.

4 CONCLUSÕES

- 1- Para o híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], maior crescimento de plântulas foi obtido com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de silicato de cálcio.
- 2- Para a espécie nativa *Brassavola perrine*, maior crescimento de plântulas foi obtido com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de silicato de cálcio.
- 3- Tanto o híbrido quanto a espécie nativa são anfiestomática, com estômatos do tipo tetracítico e anomocítico, respectivamente.
- 4- A presença do silício na estrutura foliar das espécies estudadas proporcionou o adequado desenvolvimento de plântulas de orquídeas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

BARROS, L. U.; CUNHA, C. F.; MIGUENS, F. C. Structure, morphology, and composition of silicon biocomposites in the palm tree *Syagrus coronata* (Mart.). **Becc Protoplasma**, New York, v. 220, n. 1/2, p. 89-96, Oct. 2002.

BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, P.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, ago. 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, L. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, Aug. 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137-138, Apr. 1965.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 14, n. 5, p. 214-217, Jan. 1946.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: POTAFOS, 2006. 638 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PIWPUAN, N.; THAMMATHAWORN, A. Leaf and root anatomy of acriopsis reinw. ex blume (Orchidaceae) in Thailand. **KKU Science Journal**, Khon Kaen, v. 36, n. 62, p. 58-63, Jan. 2008. Supplement.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-444.

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAUJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação in vitro de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 10-16, Jan. 2007.

ROMERO-ARANDA, M.; JURADO, O.; CUARTETO, J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 8, p. 847-855, Aug. 2006.

SCHLUTER, U.; MUSHAK, M.; BERGER, D.; ALTMANN, T. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 383, p. 867-874, Feb. 2003.

SILVA, D. P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de gébera**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, L. P. da; SILVA, L. S. da; BOHNEN, H. Componentes da parede celular e digestibilidade *in vitro* de palha de arroz (*Oryza sativa*) com diferentes teores de silício. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1205-1208, set./out. 2005.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. A. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. v. 1, p. 131-140.

STERN, W. L.; CARLSWARD, B. S. Vegetative anatomy of Calypsoeae (Orchidaceae). **Lankesteriana**, Cartago, v. 8, n. 1, p. 105-112, Jan. 2008.

TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 287-292, June 2005.

TRENHOLM, L. E.; DATNOFF, L. E.; NAGARA, R. T. Influence of silicon on drought and shade tolerance of St. Augustinegrass. **HortTechnology**, Alexandria, v. 90, n. 4, p. 14-48, Jan. 2004.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, n. 17, p. 605-613, Jan. 1949.

ZANEGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lind. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasiliense**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 101-119, fev. 2003.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec. 1995.

CAPÍTULO 2

ANATOMIA FOLIAR DE UMA ESPÉCIE NATIVA E UM HÍBRIDO DE ORQUÍDEAS MICROPROPAGADAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SILÍCIO

**Joyce Dória Rodrigues Soares, Moacir Pasqual, Aparecida Gomes de
Araujo, Evaristo Mauro de Castro, Fabricio José Pereira, Franciane
Tavares Braga**

RESUMO

A realização de pesquisas a respeito das modificações anatômicas decorrentes do cultivo *in vitro* são fundamentais para o melhor entendimento e a elucidação de lacunas existentes sobre as diferenças no desenvolvimento das plantas micropropagadas, bem como a otimização do processo de aclimatização. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar diferenças nas características anatômicas em folhas de orquídeas micropropagadas sob concentrações de silicato de cálcio. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculadas em frascos com capacidade para 250 cm³ contendo 60 mL de meio de cultura MS, acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) em ambientes de cultivo (natural, em casa de vegetação e artificial, em sala de crescimento), em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8±0,1 e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar, antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após 150 dias de cultivo, as plantas foram submetidas à avaliação anatômica, por meio de secções transversais. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Ocorreram modificações nos tratamentos contendo silício em comparação com aqueles sem silício, e entre os ambientes de luz artificial e natural. As plantas tiveram um maior crescimento nos tratamentos em luz artificial e nas doses de 0,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de silicato de cálcio para as espécies nativa e híbrida respectivamente. Os tratamentos sem a aplicação de silicato exibiram deformações no clorênquima e epiderme em comparação com o tratamento contendo silício, que podem ter afetado direta ou indiretamente o crescimento das plantas nas condições sem silício.

Palavras-chave: microscopia, orchidaceae, cultivo *in vitro*, silicato de cálcio.

ABSTRACT

The researches about anatomical modifications under *in vitro* culture are essential to the understanding and elucidation of the gaps on the differences on the development of micropropagated plants, and, the improvement on the acclimatization steps. So, this work aimed to verify differences on the anatomical traits of the leaf of orchids micropropagated under different silicon concentrations. Seedlings of *in vitro* germinated seeds of 0.5 cm length were inoculated on 250 cm³ pots with 60 mL of MS culture medium, and different silicon concentrations (0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) in different culture environment (natural on the greenhouse and artificial on the growth chamber), in all statistical combinations. The culture medium pH was fixed in 5.8 ±0.1 with 5.5 g L⁻¹ of agar, before of the autoclaving on 121°C and 1 atm by 20 min. After 150 days the plants were submitted to the anatomical analysis, by cross sections of the leaf. The experimental design was completely randomized. There was modifications on the silicon treatments against the results to the control group, and, on the artificial light treatments compared to the natural light. The plants have a higher growth in the artificial light treatment and in the 0.5 and 2.0 mg.L⁻¹ of the silicon to the native and hybrid species respectively. The treatments without silicon promoted deformations on the chlorenchyma and in the epidermis compared to the silicon treatment, that can promote effects direct or indirects the growth of the plants in the médium without silicon.

Key-words: microscopy, Orchidaceae, *in vitro* culture, calcium silicate.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos constituem a base da propagação de orquídeas, tanto através de meristemas e embriogenese somática quanto de germinação de sementes. Apesar de suas vantagens, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam certas características morfoanatômicas e fisiológicas intrínsecas ao ambiente de cultivo, tais como reduzida deposição de cera epicuticular, cutícula e epiderme pouco espessas, reduzida diferenciação do mesofilo, abundantes espaços intercelulares, feixes vasculares rudimentares e deficiente mecanismo estomático (Donnelly et al., 1985; Capellades et al., 1990; Sandoval et al., 1994; Santamaria & Kerstiens, 1994; Acuña, 1995; Romano & Martins-Loução, 2003).

Estas modificações têm sido retratadas como resultado de complexas e peculiares condições do ambiente *in vitro*, que incluem reduzida intensidade luminosa, condições assépticas, presença de fonte exógena de carbono prontamente disponível, baixa disponibilidade de CO₂, alta concentração de etileno, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente (Preece & Sutter, 1991; Kodym & Zapata-Arias, 1999; Arigita et al., 2002).

Alternativas relativas à composição do meio de cultura têm sido buscadas, no sentido de que a estrutura anatômica das plantas advindas desse ambiente desenvolvam estruturas mais adaptadas e eficientes nos processos concernentes ao desenvolvimento vegetal na fase final de aclimatização. Após serem transferidas para as condições de campo, normalmente, as alterações induzidas durante o cultivo *in vitro* sofrem adaptações (Sandoval et al., 1994). Assim sendo, o estudo de elementos relacionados à anatomia foliar irá possibilitar o entendimento das modificações fisiológicas e estruturais nas plantas micropropagadas, contribuindo para sua adaptação ao novo ambiente *ex vitro* (Marin, 2003).

O silício acrescido ao meio de cultivo pode promover efeitos benéficos nas plantas, ao aumentar o conteúdo de hemicelulose e lignina e, conseqüentemente, a rigidez na parede celular, elevando as taxas de sobrevivência de plantas durante a aclimatização (Camargo et al., 2007). A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos como aumento da capacidade fotossintética, aumento no teor de clorofila total, redução da transpiração, maior crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (Zhou, 1995).

Objetivou-se avaliar as modificações que ocorrem na anatomia e morfologia foliar em plantas micropropagadas de uma espécie de orquídea nativa (*Brassavola Perrine*) e um híbrido [*Laelia Cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Bassolaelia Cattleya* Startifire Moon Beach] sob a influência do ambiente de cultivo e de concentrações de silicato de cálcio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de março e agosto de 2008, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras.

Material vegetal - Plântulas de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], advindas de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação (nativa) ou polinização cruzada (híbrido), foram utilizadas. As sementes foram germinadas em meio de cultura Knudson C (Knudson, 1946) modificado em $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (de 0,331 para 6,62 mg L^{-1}), H_3BO_3 (de 0,056 para 1,4 mg L^{-1}) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (de 7,5 para 15 mg L^{-1}) onde permaneceram por três meses. Após este período, cada plântula de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foi inoculada em frascos com capacidade para 250 cm^3 contendo 60 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}), pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com 5,5 g L^{-1} de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas sob luz natural (casa de vegetação) e luz artificial (sala de crescimento), em todas as combinações possíveis.

Foram realizados dois experimentos idênticos, sendo um para a espécie nativa e outro para o híbrido.

Caracterização do ambiente de cultivo - **Ambiente artificial:** sala de crescimento com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. **Ambiente natural:** casa de vegetação

com iluminação natural, sombreamento de 70% (Sombrence®), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas, mínimas e médias de 26°C/32°C, 16°C /16°C e 20°C/23°C e níveis de irradiância, máximos, mínimos e médios, de 93,95 W.m⁻²/199,69 W.m⁻², 11,13 W.m⁻²/10,66 W.m⁻² e 49,38 W.m⁻²/99,43W.m⁻², referentes a dias nublados e claros típicos do período de condução do experimento.

Dados referentes à radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos na sala de crescimento e casa de vegetação, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00 horas). Para o ambiente de sala de crescimento, foi feita apenas uma medida da radiação, durante 6 horas, visto tratar-se de ambiente controlado. Para a coleta de dados referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, empregou-se um termo-higrógrafo.

Avaliações biométrica e microscopia eletrônica de luz - Ao final de 150 dias, avaliou-se comprimento da parte aérea. Foram realizadas avaliações de microscopia de luz com base nas melhores médias biométricas.

As avaliações anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA. Para tanto, utilizaram-se cinco folhas (segunda folha expandida, direção ápice-base) coletadas de cinco plantas de cada tratamento, as quais foram previamente fixadas em etanol 70% até a realização dos cortes. As avaliações foram feitas com base em observações de microscopia de luz de secções transversais sendo obtidas em micrótomo de mesa com auxílio de lâmina de aço inox (Gillette®).

A clarificação das secções transversais foi realizada em solução de hipoclorito de sódio a 50% e por 10 min., em seguida, elas foram submetidas à lavagem em água destilada por 10 min. e coradas com safrabau (safranina e azul

de Astra 7,5:2,5), seguindo metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). Posteriormente, as secções foram montadas em glicerina a 50%. Com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100, equipado com uma ocular micrométrica e objetiva de 40X, foram efetuadas medições das espessuras das epidermes das faces adaxial e abaxial e do mesofilo, sendo efetuadas cinco medições em cada folha.

Delineamento experimental e análises estatísticas - O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, tanto no experimento com a espécie nativa (*Brassavola perrine*) quanto com o híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], ambos em esquema fatorial 2x4, sendo dois ambientes (natural e artificial) e 4 concentrações de silicato de cálcio (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), com 12 plântulas por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando-se o software estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Biométrica

Houve interação significativa entre concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo influenciando o comprimento da parte aérea (Tabela 1). Tanto para a espécie nativa quanto para o híbrido, o maior comprimento foi obtido em ambiente de luz artificial, sendo que ocorreu em média um aumento de 53,8% na luz artificial em relação ao ambiente natural, quando se compara os valores obtidos na melhor dose de silício para a espécie híbrida e de 90,9% para essa variável na espécie nativa (Tabela 1). Esse aumento que ocorreu no ambiente de luz artificial pode ser devido à baixa intensidade de radiação desse ambiente, que pode ter provocado estiolamento dos tecidos da parte aérea da planta, gerando maiores comprimentos.

Plantas em ambiente de sombra ou baixa irradiação podem exibir estiolamento como uma estratégia de alcançar ambientes mais iluminados (Taiz & Zeigler, 2004). O efeito observado nesse trabalho pode ser relacionado à baixa quantidade de comprimentos de onda na faixa do vermelho nas lâmpadas utilizadas na sala de crescimento, que podem não ser suficientes para ativar a resposta do fitocromo e inibir totalmente a condição estiolada, promovendo o aumento do comprimento observado. Esse fato pode ser associado, também, ao habitat de sub-bosque, típico para as orchideaceae dos gêneros *Brassavola*, *Catleya* e *Laelia* (Zanega-Godoy & Costa, 2003), que englobam o híbrido e a espécie nativa do presente estudo, que pode ter favorecido, de certa forma, o estiolamento, mas também gerando boas condições para o desenvolvimento das orquídeas em estudo.

A adição de silício nos meios de cultura favoreceu o crescimento do híbrido e da espécie nativa em ambos os ambientes (Tabela 1). No híbrido, os maiores comprimentos foram observados na dose de 2,0 mg.L⁻¹, com valores

42,3% maiores que na dose sem silício na luz artificial, e de 61,4% nas plantas sob luz natural (Tabela 1). Na espécie nativa, sob luz natural, ocorreram os maiores valores na dose de 0,5 mg.L⁻¹, com valores 9,2% superiores que no tratamento sem silício e, sob luz natural, os valores foram 69,9% superiores que o tratamento sem silício (Tabela 1). Nessa espécie, ocorreu ainda uma possível inibição do crescimento quando o silício foi adicionado em doses maiores, que podem ser relacionadas a uma alteração no coeficiente de extensibilidade das paredes celulares (Jones, 1992) pela incorporação de silício, que pode dificultar o alongamento celular (Soares et al., 2008).

A ação do silício no crescimento dessas espécies de orquídea é evidente, e a espécie nativa e o híbrido responderam de forma semelhante ao tratamento. O efeito do silício é mais intenso sob luz artificial, sendo que, nessa última, o efeito sob luz artificial foi acentuadamente superior ao da natural. A incorporação de sílica pode estar auxiliando na sustentação da planta, por promover maior resistência do tecido à ação mecânica e por essa sílica poder se incrustar na parede celular. Essa sustentação pode estar auxiliando no crescimento das plantas por permitir alongamento sem grande curvatura, provocada pelo próprio peso da planta.

TABELA 1 Médias obtidas para comprimento da parte aérea (cm) em relação ao ambiente de cultivo: luz artificial (LA) e luz natural (LN) e concentrações de CaSiO₃ (mg L⁻¹) para o híbrido e espécie nativa.

<i>Dose CaSiO₃</i> <i>(mg.L⁻¹)</i>	<i>Híbrido</i>		<i>Espécie nativa</i>	
	<i>LA</i>	<i>LN</i>	<i>LA</i>	<i>LN</i>
0,0	1,98 Ab	1,14 Bb	6,50 Ab	2,19 Bb
0,5	1,10 Ac	0,85 Bb	7,10 Aa	3,72 Ba
1,0	1,00 Ac	0,86 Bb	6,00 Ab	3,26 Ba
2,0	2,83 Aa	1,84 Ba	5,00 Ac	1,80 Bb

As médias seguidas pela mesma letra na coluna para as doses de silício (letras minúsculas) e na linha (letras maiúsculas) para os diferentes ambientes não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados positivos sobre o crescimento de plântulas de orquídea corroboram afirmações de Zhou (1995) de que doses entre 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de SiCaO₃, acrescidas ao meio de cultura VW (Vacin & Went, 1949) modificado, proporcionam maior crescimento da parte aérea de plantas de *Phalaenopsis*.

Os benefícios da utilização da sílica tem sido associados a diversos efeitos indiretos como aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração e, conseqüentemente, maior crescimento de plantas (Zhou, 1995). Este resultado é desejável uma vez que o crescimento dessas plantas de orquídeas é sobremaneira lento, quando comparado a outras espécies ornamentais, dificultando a obtenção de mudas aptas ao comércio.

Análise em microscopia de luz

Espécie nativa

As folhas analisadas em secção transversal apresentaram mesofilo homogêneo com média de 342,97 µm de espessura, aproximadamente nove camadas de células, epiderme uniestratificada, com maiores espessuras das faces adaxial e abaxial nos tratamentos que continham CaSiO₃ acrescido ao meio de cultura (Tabela 2).

TABELA 2 Médias obtidas para as variáveis espessura do mesofilo (µm), epiderme abaxial (µm) e epiderme adaxial (µm) em relação a concentrações de CaSiO₃ (mg L⁻¹) em ambiente de sala de crescimento para a espécie nativa de orquídea.

<i>CaSiO₃ (mg L⁻¹)</i>	<i>Mesofilo</i>	<i>Epiderme adaxial</i>	<i>Epiderme abaxial</i>
0	296,222 b	15,849 b	20,815 b
0,5	342,972 a	22,310 a	26,313 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A epiderme se constitui de células aproximadamente isodiamétricas a levemente tabulares, com poucos espaços celulares e ausência de cutícula, hipoderme com uma camada de células, sendo que estas são maiores que as células da epiderme e também são isodiamétricas. As folhas desta espécie apresentam feixes vasculares colaterais com floema voltado para a face abaxial e metaxilema pouco diferenciado. Circundando os feixes vasculares, tem-se a bainha do feixe e camadas de mesofilo formando a estrutura krantz. Ainda no clorênquima, verifica-se a presença de poucas fibras. As células buliformes da região mediana da folha mostraram-se alteradas com redução do diâmetro e também apresentam células em colapso. Os feixes vasculares foram reduzidos no número e tamanho nas plantas sem silício, apresentando ainda tecidos (floema e xilema) menos diferenciados e com aspecto deformado (Figura 1).

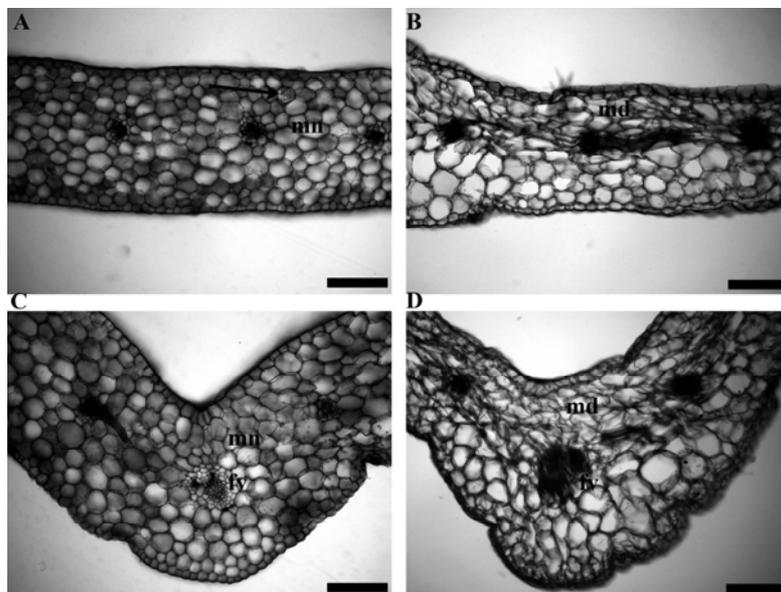


FIGURA 1 Secções transversais de folhas de orquídeas nativas sob presença (A e C) e ausência (B e D) de silício. Mn= mesofilo normal, md= mesofilo deformado, fv= feixe vascular, seta= ráfides de oxalato de cálcio. Barras= 50 µm.

Nas superfícies adaxial e abaxial foi verificada a presença de estômatos do tipo tetracítico tanto no híbrido quanto na espécie nativa, com maior frequência na face da epiderme adaxial, o que classifica a folha como anfi-epiestomática (Tabela 3). De acordo com Zanenga-Godoy & Costa (2003) foram observados estômatos tetracíticos para quatro espécies do gênero *Cattleya* (nativas do planalto central brasileiro), em ambas as faces da folha, como no presente estudo. Não houve diferença significativa entre os fatores para a variável densidade estomática na epiderme abaxial, porém na epiderme adaxial maiores médias foram obtidas na ausência de silicato de cálcio.

A relação diâmetro polar/equatorial mostrou maior funcionalidade no tratamento controle na epiderme adaxial, sendo que na epiderme abaxial não houve diferença significativa, mostrando assim que o silício não influenciou positivamente as variáveis relativas ao estômato. No entanto, a análise do número de células mostrou investimento da planta em células de formato maior e em menor número tanto na epiderme abaxial quanto na adaxial (Tabela 3), concordando assim com o trabalho realizado por Romero-Aranda et al. (2006).

Esses fatos demonstram que ocorreu uma restrição causada pelo silício no desenvolvimento das características estomáticas para essa espécie nativa. Sendo assim, a redução da DE associada com uma redução da funcionalidade pode indicar que os estômatos dessa espécie sem a presença de silício podem ser mais capazes de captar o CO₂ e evitar a perda de água, e a maior densidade pode favorecer as funções estomáticas, se associada às características de funcionalidade, descrita por Braga et al. (2009), como importante para a fase de aclimatização das plantas micropropagadas.

TABELA 3 Densidade estomática (DE), diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DEq), relação diâmetro polar/equatorial e número de células (NC) em relação a concentrações de CaSiO_3 (mg L^{-1}) em ambiente de sala de crescimento para a espécie nativa de orquídea.

Dose CaSiO_3 (mg.L^{-1})	Epiderme abaxial				
	DE (mm^2)	DP (μm)	DEq (μm)	DP/DE (μm)	NC (mm^2)
0	29,85a	31,09a	26,45a	1,26a	196,6a
0,5	31,04a	33,26a	27,46a	1,13a	169,8b
CV(%)	26,7	9,9	5,6	8,9	7,0
	Epiderme adaxial				
0	46,57a	32,47a	24,95b	1,30a	244,2a
0,5	34,63b	30,14a	28,15a	1,07b	206,8b
CV(%)	12,1	5,7	7,2	6,1	10,8

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Próximo à nervura central na região mediana da folha, voltada para a face adaxial, ocorrem células buliformes formando grupos de aproximadamente 5 células, com deposições de sílica próximas às paredes periclinais (Figuras 1 e 2). Esses corpos silicosos são também verificados, ocasionalmente, nas paredes periclinais das células do clorênquima. Ocorre também a presença de idioblastos contendo drusas mais próximas à epiderme adaxial (Figura 1).

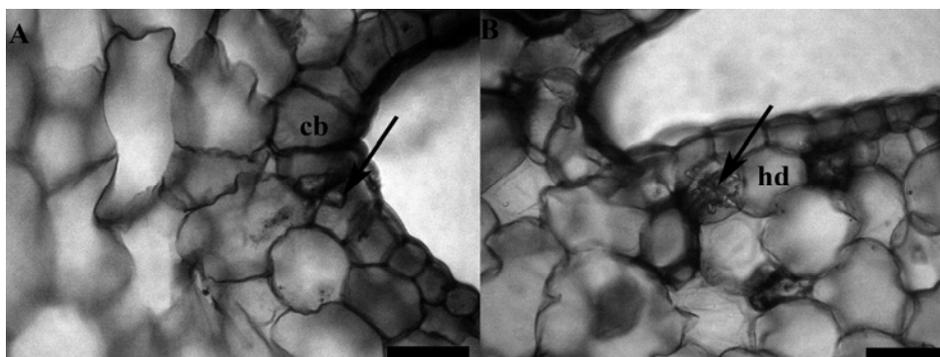


FIGURA 2 Deposições de sílica (setas) nas células buliformes (A) e hipoderme (B) de plantas de orquídea em tratamento contendo silicato. cb= célula buliforme, hd= hipoderme. Barras= 20 µm.

A vista frontal da epiderme dessas folhas revelou estômatos do tipo tetracíticos tanto para a espécie nativa quanto para o híbrido projetados de forma mais externa em relação à epiderme, com câmara subestomática de tamanho reduzido (em secção transversal) e pouca cutina nas células guarda. As demais células epidérmicas em vista frontal possuem morfologia variada podendo ir de isodiamétrica a alongada, distribuídas aleatoriamente com paredes anticlinais pouco sinuosas, podendo conter corpos silicosos (Figura 3).

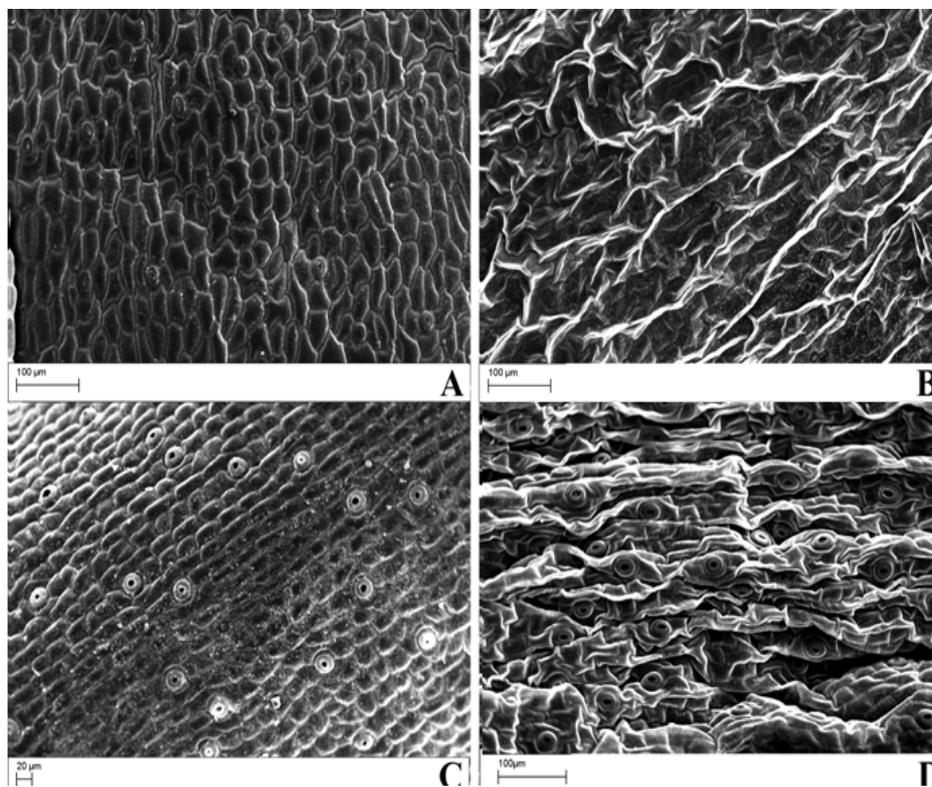


FIGURA 3 Vista frontal da epiderme da espécie nativa com silício (A) e sem silício (B) e do híbrido com silício (C) e sem silício (D).

Na secção transversal das folhas do tratamento controle, não foram verificadas deposições de sílica, seja nas células buliformes, clorênquima ou nas paredes anticlinais das células da epiderme e hipoderme. O mesofilo exibiu deformações das células do clorênquima nas mais próximas à face adaxial, demonstrando assim um colapso de células (Figura 1), estas estatisticamente menores que as encontradas na (Tabela 2) . Foi verificado também um aumento das células do clorênquima voltado para a face abaxial, quando comparadas às folhas submetidas ao tratamento com silicato de cálcio, o mesofilo das folhas dos meios contendo silício foram 15,8% mais espessos que o tratamento controle, sendo que a epiderme adaxial foi 40,7% mais espessa que as do

controle e a epiderme abaxial foi 26,4% no tratamento com silício em comparação com o controle (Tabela 2).

A vista frontal da epiderme demonstra clara deformação do tecido nos meios sem silício em comparação com os que possuíam silicato em sua composição (Figura 3). Esse aspecto pode ser relacionado com a deformação das camadas mais internas de clorênquima nas folhas do meio sem silício (Figura 1), esse fato demonstra que o silício pode estar relacionado com o sistema de sustentação das folhas das espécies em estudo, podendo estar se incorporando nas paredes celulares e auxiliando na manutenção da estrutura foliar, sendo imprescindível para o correto desenvolvimento dessas plantas, visto que o clorênquima, responsável pela fotossíntese (Esaú, 1974), se deformado, pode prejudicar a fotossíntese e o crescimento das plantas, fato que foi observado pelas restrições no crescimento observado nessas plantas sem silício (Tabela 1). Dessa forma, observa-se que a presença de silício no meio de cultura pode ser uma grande contribuição para o correto desenvolvimento das plântulas de orquídeas micropropagadas.

Espécie híbrida

Para a espécie híbrida em secção transversal, o mesofilo é composto de clorênquima homogêneo com média de 724,08 μm de espessura e aproximadamente 17 camadas de células (Tabela 4). A estrutura interna das folhas é semelhante na espécie híbrida em comparação com a nativa, também possui epiderme uniestratificada, feixes vasculares colaterais, estômatos tetracíticos e morfologia dos tecidos muito parecida com a espécie nativa (Figura 4). Contudo, as folhas da espécie híbrida são mais espessas tanto na região da lâmina foliar quanto na região mediana da folha, devido a um maior número de camadas celulares e maior tamanho das células (Figura 4). Os estômatos exibem

estrutura mais arredondada e aparentemente menos funcionais que os observados para a espécie nativa (Figura 3).

TABELA 4 Médias obtidas para as variáveis espessura do mesofilo (μm), epiderme abaxial (μm) e epiderme adaxial (μm) em relação a concentrações de CaSiO_3 (mg L^{-1}) em ambiente de sala de crescimento para a espécie híbrida de orquídea.

<i>CaSiO₃</i> (mg L ⁻¹)	<i>Mesofilo</i>	<i>Epiderme adaxial</i>	<i>Epiderme abaxial</i>
0	558,307 b	14,868 b	16,386 b
2,0	724,084 a	19,275 a	24,078 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Semelhante ao que aconteceu na espécie nativa, o tratamento com silício promoveu um desenvolvimento mais correto das plântulas, ocorrendo o efeito de deformação do clorênquima observado para as plantas em meio de cultura sem silício (Figuras 3 e 4), os depósitos de silício (Figura 2) foram observados apenas nos tecidos das plantas que cresceram no meio de cultura contendo silício. Novamente, observa-se um maior desenvolvimento dos tecidos nas plantas com crescimento em meio contendo silício (Tabela 4), com o mesofilo sendo 29,7% maior nas plantas em meio com silício em relação às de meios sem silício, ocorreram ainda, médias 29,5% superiores para a epiderme adaxial e 46,9% maiores na epiderme abaxial das plantas com silício em comparação com as sem silício. Dessa forma, as plantas contendo silício no meio de cultura podem possuir maior capacidade de fotossíntese e maior restrição na transpiração, promovendo, dessa forma, o crescimento dessas plantas, como foi observado nessas plantas dos meios de cultura contendo silício (Tabela 1).

Os estômatos da espécie híbrida possuem formato do tipo tetracítico (Figura 3) e estão presentes em ambas as faces da epiderme, adaxial e abaxial, com maior frequência, porém, na face abaxial, tais características classificam esta orquídea como uma espécie anfi-hipoestomática. De acordo com Alquini et al. (2006), o tipo tetracítico é frequente em numerosas famílias de monocotiledôneas, o qual é envolvido por quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células-guarda, sendo o par restante polar e frequentemente menor.

A maior DE foi observada em plantas tratadas com silicato de cálcio tanto na epiderme abaxial quanto na adaxial. A relação diâmetro polar/equatorial apresentou melhor valor ausência da fonte de silício, mostrando uma provável maior funcionalidade no tratamento controle, assim como na espécie nativa.

TABELA 5 Médias obtidas para as variáveis densidade estomática (DE), diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE), relação diâmetro polar/equatorial e número de células (NC) em relação a concentrações de CaSiO_3 (mg L^{-1}) em ambiente de sala de crescimento para a espécie híbrida de orquídea.

Dose CaSiO_3 (mg.L^{-1})	Epiderme abaxial				
	DE (mm^2)	DP (μm)	DE (μm)	DP/DE (μm)	NC (mm^2)
0	34,64b	33,20b	32,76b	1,01a	131b
2,0	54,92a	37,18a	35,56a	1,04a	145,4a
CV(%)	17	6,7	3,4	6,4	6,5
Epiderme adaxial					
0	19,10b	31,22a	27,39b	1,14a	101,4b
2,0	39,40a	31,04a	36,47a	0,85b	112,4a
CV(%)	24	5,3	5,2	8,9	5,7

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ocorreram reduções no número e tamanho dos feixes vasculares observados nas plantas dos meios de cultura sem silício em comparação com as

plantas dos meios de cultura contendo silício (Figura 4). Devido ao papel essencial dos tecidos vasculares na distribuição de água e fotoassimilados (Taiz & Zeigher, 2004), o prejuízo nesses tecidos pode comprometer o correto desenvolvimento das plantas, e, em combinação às restrições no clorênquima dessas plantas, podem ter contribuído para o menor desenvolvimento das plantas em meios sem silício em comparação com as plantas de meio com silício.

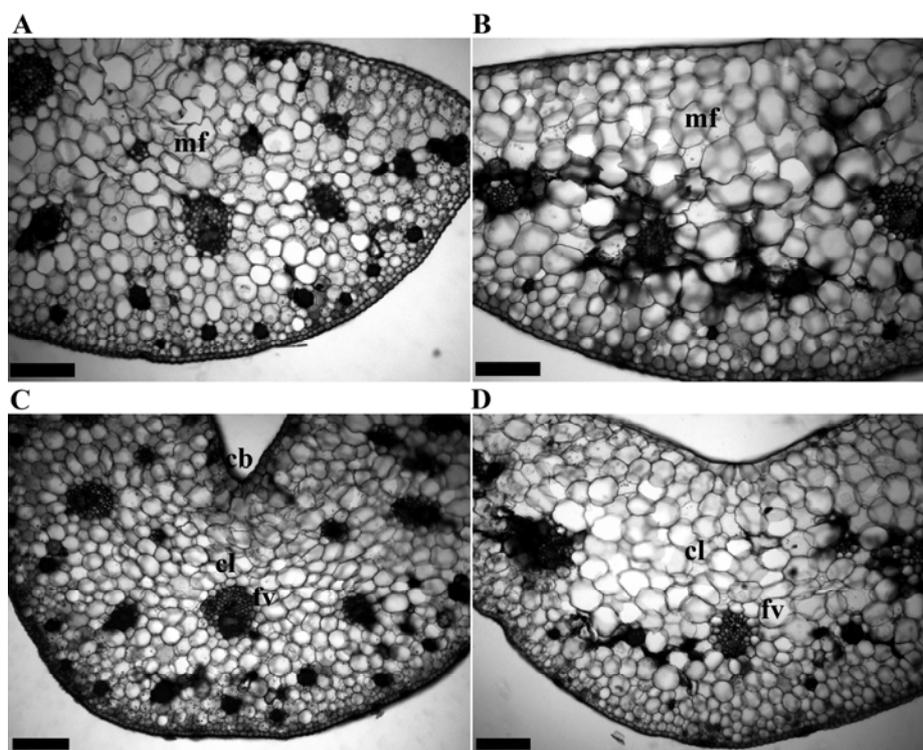


FIGURA 4 Secções transversais de folhas da espécie híbrida de orquídea, cultivadas em meio contendo silício (A e C) e sem silício (B e D). barras= 50 μ m.

4 CONCLUSÕES

O cultivo do híbrido em luz artificial e meio com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CaSiO_3 e da espécie nativa em luz artificial e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CaSiO_3 promovem maior crescimento de plântulas.

A adição de Si ao meio favorece a anatomia foliar de plântulas de orquídea.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, P. I. Micropropagación de banano a partir de ápices vegetativos. **Corbana**, San José, v. 17, n. 39, p. 9-12, 1995.
- ALQUIMI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. V.; BARROS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 87-108.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, May 2002.
- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *dendranthema grandiflorum* cv. rage: características morfofisiológicas. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.
- CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, ago./set. 2007.
- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, Jan. 1985.
- DUARTE, M. do R.; LOPES, J. F. Análise fotônica e ultra-estrutural da epiderme foliar de *galinsoga parviflora* cav. e *g. ciliata* (raf.) blake, asteraceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 41-46, jan. 2004.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blucher; EDUSP, 1974. 293 p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

JONES, H. G. **Plants and microclimate**: a quantitative approach to environmental plant physiology. 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 1992. 428 p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 14, n. 5, p. 214-217, Jan. 1946.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-149, Apr. 1999.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1997. 198 p.

MARIN, J. A. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, n. 1, p. 139-142, Jan. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation technology and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Strategies to improve rooting and acclimatization of cork oak. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p. 275-278, 2003.

ROMERO-ARANDA, M.; JURADO, O.; CUARTETO, J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 8, p. 847-855, Aug. 2006.

SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan./Feb. 1994.

SANTAMARIA, J. M.; KERSTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 2, p. 191-195, June 1994.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; CARVALHO, J. G. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 626-629, mar./abr. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

VACIN, E. T.; WENT, F. W. PH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, n. 17, p. 605-613, Jan. 1949.

ZANEGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lind. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasiliense**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 101-119, jan. 2003.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec. 1995.

CAPÍTULO 3

ESTIOLAMENTO E LUZ ARTIFICIAL INFLUENCIANDO A BROTAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE ESPÉCIES NATIVA E HÍBRIDA DE ORQUÍDEAS

**Joyce Dória Rodrigues Soares, Moacir Pasqual , Aparecida Gomes de
Araujo, Filipe Almendagna Rodrigues**

RESUMO

O uso de mudas micropropagadas de orquídeas encontra-se bastante difundido no mercado florístico uma vez que o ciclo reprodutivo das mesmas é significativamente reduzido. Dessa forma, estudos que possibilitem redução dos custos de produção e a melhoria na qualidade das mudas obtidas podem tornar ainda mais evidente o emprego deste tipo de material propagativo. Objetivou-se avaliar a influência de ambientes de cultivo e de concentrações de BAP e ANA em relação à brotação e crescimento de plântulas de orquídeas nativa (*Laelia crispata*) e híbrida [(*Laelia Cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Bassolaelia Cattleya* Startifire Moon Beach]. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente 0,6 cm de comprimento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS, acrescido de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ambientes de cultivo (escuro e sala de crescimento com luz artificial), em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8±0,1 e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Ao final de 150 dias, foram realizadas avaliações fitotécnicas quanto ao número de brotos, folhas e de internós (contagem direta), comprimento médio da parte aérea (auxílio de régua milimetrada).

Palavras-chave: orchidaceae, micropropagação, ambiente de cultivo.

ABSTRACT

The use of micropropagated seedlings of orchids is very widespread in floristic broadcast market since the reproductive cycle of the same is significantly reduced. Thus, studies that allow reduction of production costs and improving the quality of seedlings obtained may make it more clear the use of such material spread. The objective was to evaluate the influence of environments for growing concentrations of BAP and NAA on the sprouting and growth of seedlings of native orchids (*Laelia crispata*), and hybrid [(*Laelia Cattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia Cattleya* Startifire Moon Beach]. Seedlings from seeds germinated *in vitro* with approximately 0.6 cm long were inoculated in test tubes containing 15 mL of culture medium MS plus BAP (0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹), NAA (0, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and the growing environment (dark and room for growth with artificial light) in all possible combinations. The culture medium had its pH adjusted to 5.8 ± 0.1 and solidified with 5.5 g L⁻¹ of the agar before autoclaving at 121 ° C and 1 atm for 20 minutes. At the end of 150 days were evaluated Fitotecnia on the number of shoots, leaves and internal (direct counting), the average length of shoots (means of ruler millimeter).

Key words: orchidaceae, micropropagation, environment of cultivation.

1 INTRODUÇÃO

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. Um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas. Naturalmente, ocorre a deiscência das cápsulas e as sementes são lançadas no ambiente e, ao entrarem em contato com as micorrizas nas raízes das plantas adultas da mesma espécie, se associam e germinam.

Assim sendo, germinação *in vitro* vem sendo utilizada com sucesso desde a década de sessenta, onde se obteve a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas (Faria & Stancato, 1998). Nos anos subsequentes, outros métodos de micropropagação, utilizando as mais diferentes fontes de explantes, foram testados com sucesso. A micropropagação é uma alternativa que maximiza a propagação de várias espécies, tendo como vantagens a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de grande número de plantas sadias e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes (Grattapaglia & Machado, 1998).

O estiolamento de brotos pode ampliar a taxa de multiplicação. Esta técnica proporciona desenvolvimento de brotos e caules na ausência de luz, causando alongamento e coloração amarela ou branca em razão da ausência de clorofila (Hartmann & Kester, 1990). Suzuki (1999) afirma que plantas de *Catasetum fimbriatum*, quando cultivadas *in vitro* no escuro, apresentam estiolamento caulinar, podendo seus segmentos nodais serem utilizados para a propagação vegetativa. O caules estiolados apresentam folhas bastante reduzidas, escamiformes, com alongamento dos internós. Cada nó apresenta uma

gema lateral, que poderá dar origem a um novo broto ou explante (Kerbaux et al., 1995).

O estiolamento tem sido utilizado com sucesso na micropropagação de outras espécies cultivadas. Em abacaxizeiro, cultivar Pérola, Moreira et al. (2003) obtiveram 10,26 brotações, após quarenta dias de cultivo *in vitro* no escuro, utilizando meio MS + 1,8 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina), sendo que os maiores brotos estiolados (10,86 cm em média) foram produzidos na ausência de fitorreguladores. Após sessenta dias de cultivo *in vitro*, na ausência de luz, Barboza & Caldas (2001) obtiveram em média 11,3 brotos para o híbrido PESC 52 de abacaxizeiro. Verificaram, ainda, que a adição de ANA (ácido naftaleno acético) e AIA (ácido 3-idolacético) não foram eficientes para estimular a formação de brotos estiolados.

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da adição de fitorreguladores ao meio de cultura para obtenção de novas brotações em cultivo *in vitro* de *Laelia crispata* e [(*Laelia Cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia Cattleya* Startifire Moon, mediante o estiolamento de segmentos caulinares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de fevereiro e julho de 2008, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras.

Material vegetal - Plântulas de uma espécie nativa de orquídea (*Laelia crispata*) e de um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], advindas de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação (nativa) ou polinização cruzada (híbrido) foram utilizadas. As sementes foram germinadas em meio de cultura Knudson C (Knudson, 1946) modificado em $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (de 0,331 para 6,62 mg L^{-1}), H_3BO_3 (de 0,056 para 1,4 mg L^{-1}) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (de 7,5 para 15 mg L^{-1}), onde permaneceram por três meses. Após este período, cada plântula de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foi inoculada em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de benzilaminopurina-BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L^{-1}) e ácido naftalenoacético-ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}), em ambientes de cultivo (sala de crescimento sob luz artificial e sob ausência completa de luz), em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com 5,5 g L^{-1} de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

Caracterização do ambiente de cultivo - Sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), irradiância de $42 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a indução do estiolamento, parte das culturas foram mantidas

também em sala de crescimento, porém sob ausência de luz, mantendo-se a mesma temperatura.

Avaliações fitotécnicas - Ao final de 150 dias, avaliou-se número de brotos, comprimento da parte aérea e número de internós .

Delineamento experimental e análises estatísticas - O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, tanto no experimento com orquídea nativa (*Laelia crispata*) quanto com o híbrido [(*Laelia Cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia Cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Bassolaelia Cattleya* Startifire Moon Beach], ambos em esquema fatorial 3x3x2, sendo três concentrações de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), três de ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (luz artificial e ausência de luz), com 12 plântulas por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise conjunta dos ambientes. Para isso, o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000) foi utilizado, sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Decorrido o período de incubação no escuro, observou-se que grande parte das plântulas mostrava o fenótipo de plantas estioladas e aclorofiladas, ou seja, caules esbranquiçados, com aspecto translúcido, apresentando as folhas pequenas e os entrenós mais longos. Em todos os tratamentos, surgiram novas brotações a partir da base e/ou nos nós, as quais também se apresentavam estioladas. Torres et al. (1998) e Taiz & Zeiger (2004) citam a ocorrência destas características em plantas mantidas no escuro por determinado tempo, sendo que nestes casos há inibição do desenvolvimento de cloroplastos e diminuição nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos. Raven et al. (2001) ratificaram estas afirmações, acrescentando que tais plantas, quando colocadas na presença de luz, retomam a expansão e o desenvolvimento normal.

As plântulas estioladas, assim que retornaram às condições de luminosidade, foram adquirindo a coloração verde (Figura 1) e apresentaram aspecto translúcido quando mantidas na ausência de luz (Figura 1 A e E), provavelmente, à medida em que a ontogênese de cloroplástideos foi realizada (Taiz & Zeiger, 2004), as plantas adquiriram um aspecto de pigmentação crescente dos 20 (Figura 1 B e F) aos 40 dias após o retorno à luz (Figura 1 C e G). As plântulas mantidas sob luz artificial em sala de crescimento apresentaram desenvolvimento fotossintético normal, porém, como não é característica para ambas as espécies, não houve crescimento em internós, e as folhas surgiram apenas da brotação principal, o que caracteriza uma desvantagem em termos de produção massal de mudas (Figura 1).

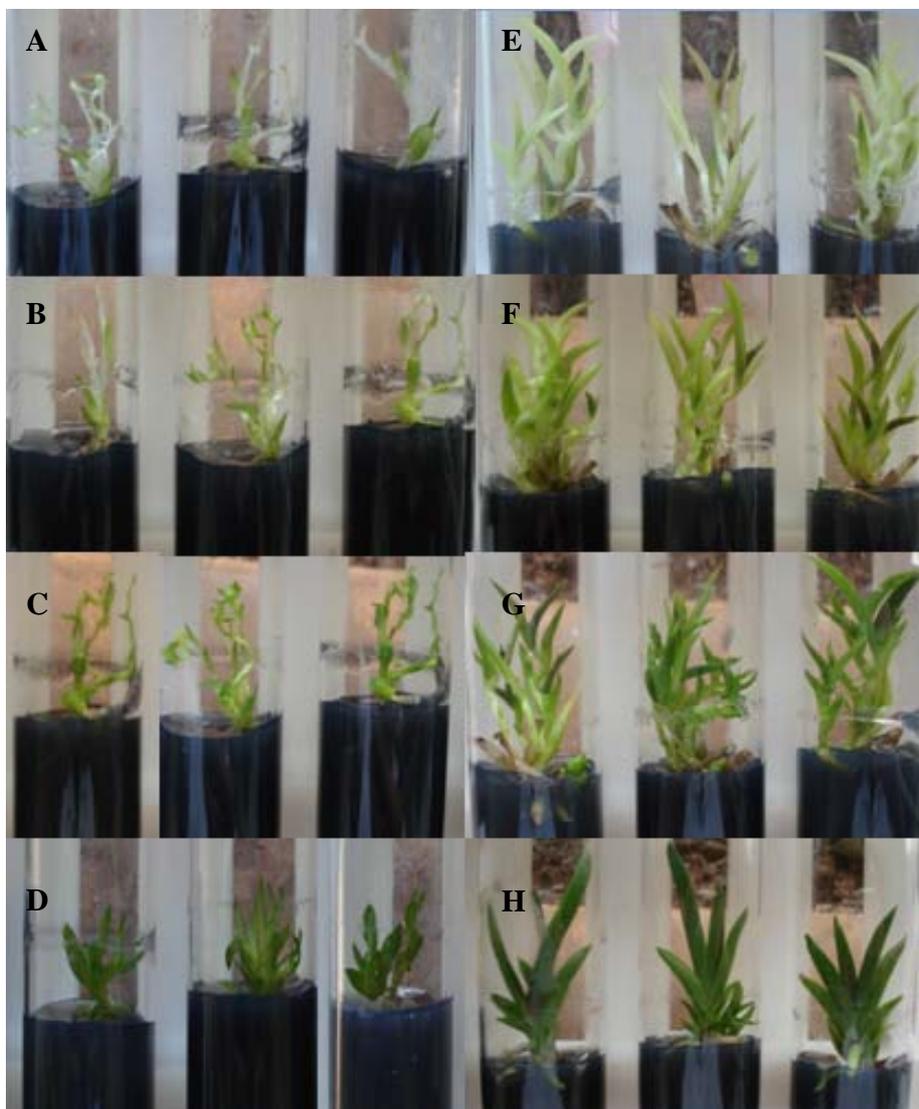


FIGURA 1 Plântulas de [*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda] x *Bassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach] (A, B, C e D) e de *Laelia crispata* (E, F, G e H) cultivadas em ausência (A e E) e presença de luz (D e H) e sob exposição gradativa à luz (B, C, F e G), em meio de cultura com concentrações de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹).

Nenhuma interação significativa entre os três fatores estudados (ambiente x BAP x ANA) foi observada para a o cultivo *in vitro* de ambas as orquídeas. Nesta condição, efeito significativo ocorreu somente entre as interações ambiente x BAP e ambiente x ANA para todas as variáveis analisadas.

O número de brotos em plântulas da orquídea nativa foi significativamente superior no escuro independente da concentração do fitorregulador utilizado. Analisando-se o ambiente de cultivo no escuro, não houve diferença significativa para as concentrações de BAP, porém foi observada significância para as concentrações de ANA, sendo que o acréscimo de 2,0 mg L⁻¹ ao meio de cultivo mostrou-se benéfico, obtendo-se em média 3,15 brotos (Tabela 1). Em relação ao híbrido de orquídea, o mesmo comportamento para o fator ambiente foi observado, porém houve significância para o fator BAP em ausência de luz, sendo que maior número de brotos foi obtido com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e, para o fator ANA maiores resultados foram obtidos em sua ausência (Tabela 1).

TABELA 1 Número de brotos em plântulas de uma espécie nativa e um híbrido de orquídea em diferentes ambientes de cultivo (Luz artificial e escuro) sob a influência de concentrações de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) após 150 dias de inoculação *in vitro*.

Orquídea nativa								
Ambiente de cultivo	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	1,66bB	2,35Aa	2,23aB	2,10B	1,81bA	1,91bB	2,23aB	2,10B
Escuro	2,56aA	2,67aA	2,89aA	2,70A	2,48bA	2,50bA	3,15aA	2,70A
Médias	2,11b	2,51a	2,56a		2,14b	2,20b	2,69a	
CV (%)	25							

“...continua...”

” TABELA 1, Cont.”

Orquídea híbrida								
Luz	1,93aA	2,16aA	1,73aB	2,03B	1,60bB	2,23aA	2,25aB	2,03B
Escuro	2,15bA	2,21bA	2,86aA	2,31A	2,86aA	2,33bA	1,75cA	2,31A
Médias	2,04b	2,18a	2,29a		2,23a	2,28a	2,00b	
CV (%)	27							

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O acréscimo de BAP ao meio de cultura não foi benéfico para a obtenção de brotações da espécie nativa. Estes resultados concordam com Suzuki (1999) e Ramos & Carneiro (2007) que, trabalhando com *Cattleya fimbriatum* e *Cattleya mesquिताe*, respectivamente, obtiveram aumento de brotações na ausência de BAP. O nível endógeno de citocininas no escuro é maior do que na presença de luz (Suzuki, 1999). Este fato pode ter ocorrido também com os explantes de *Laelia crispata* cultivados sob ausência de luz. Possivelmente, houve aumento excessivo do nível endógeno desse fitorregulador, quando BAP foi utilizado no meio de cultura. A adição de ANA ao meio, ainda no ambiente de ausência de luz, não foi benéfica, proporcionando uma relação citocinina/auxina que fez com que a planta direcionasse parte de seu esforço metabólico para a obtenção de brotações em detrimento ao crescimento.

A adição de citocinina foi benéfica para a obtenção de brotações do híbrido, sendo observadas, portanto, diferenças na capacidade proliferativa das duas espécies. Segundo Quisen (2002), tais resultados podem estar associados à interação genótipo e citocinina. Daí a necessidade de se otimizar a cada genótipo o nível exógeno ou mesmo o tipo de fitorregulador a ser adicionado ao meio.

A altura da brotação principal da espécie nativa de orquídea apresentou efeito significativo para ambiente e cada um dos fitorreguladores, sendo que em ambos a maior altura foi obtida no escuro quando comparado com o cultivo em

presença de luz. Verifica-se que houve efeito negativo dos níveis de BAP em relação ao meio sem essa citocinina no escuro, o que foi caracterizado pela acentuada redução do comprimento à medida que se elevou a concentração deste fitorregulador (Tabela 2). Porém, para o fator ANA, houve efeito positivo para o acréscimo desta auxina ao meio de cultura com a incubação no escuro, obtendo-se em média 4,33 cm de altura em média. Para o híbrido, não houve efeito significativo para o incremento de BAP ao meio de cultura, porém foi observada significância para as concentrações de ANA com efeito negativo em seu acréscimo, obtendo assim maior altura de brotações sem a adição destes reguladores de crescimento no ambiente de ausência de luz (Tabela 2).

TABELA 2 Altura da brotação principal (cm) de plântulas de uma espécie nativa e um híbrido de orquídea em diferentes ambientes de cultivo (Luz artificial e escuro) sob a influência de concentrações de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) após 150 dias de inoculação *in vitro*.

Orquídea nativa								
Ambiente de cultivo	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	3,08aB	3,21aA	3,67aB	3,32B	2,79bB	3,35aB	3,81aB	3,32B
Escuro	4,30aA	3,79bA	3,87bA	3,39A	3,29bA	4,33aA	4,35aA	3,39A
Médias	3,69a	3,50a	3,77a		3,04b	3,84a	4,08a	
CV (%)	14							
Orquídea híbrida								
Luz	2,10aB	1,87aB	1,91aB	1,96B	1,96aB	1,88aB	2,06aA	1,96B
Escuro	2,60aA	2,47aA	2,45aA	2,51A	2,52aA	2,70aA	2,29bA	2,51 ^a
Médias	2,35a	2,17a	2,18a		2,24a	2,29a	2,17a	
CV (%)	13							

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pode-se atribuir os resultados da altura da brotação principal na espécie nativa aos efeitos do BAP em quebrar a dominância apical e favorecer a emissão de novos brotos (Mok et al., 2000). De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o alongamento pode ser inibido pelo efeito acumulativo do regulador de crescimento presente no meio. Estudos realizados por Diniz et al. (2003) demonstraram que a adição de BAP no meio de cultura também causou redução no comprimento de brotações de macela. Em bananeira, Souza & Gonçalves (1996) verificaram que, em meio de cultura sem a presença de BAP, a cv. Caipira apresentou forte dominância apical, contrário aos tratamentos com doses crescentes desta citocinina. Por sua vez, o acréscimo de ANA demonstrou efeito antagônico ao BAP, proporcionando assim crescimento significativo da brotação principal. Suzuki et al. (2004), estudando o estiolamento de *Cattleya fimbriatum*, obtiveram maior altura da brotação principal com o incremento de auxina ao meio de cultivo (Vacin & Went, 1949).

Por outro lado, não se observou diferença significativa quando se utilizou diferentes concentrações de BAP no híbrido cultivado em ausência de luz. Aliado a este fato, o acréscimo da auxina não foi benéfico para o crescimento. Apesar disso, sabe-se que esta é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações, quando colocados em condições de luz (Moreira et al., 2003). Em *Cattleya fimbriatum*, Suzuki (1999) obteve plantas com caules significativamente maiores, quando incubados na ausência de luz em detrimento à presença de luz, independentemente da natureza do regulador de crescimento e das concentrações utilizadas, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho para o híbrido.

A adição de BAP ao meio de cultura para a propagação *in vitro* de *Laelia crispata* influenciou significativamente, porém, com efeito negativo no aumento da produção de nós por explante. O ANA, por outro lado, foi benéfico, obtendo-

se maior número de internós com o acréscimo de 2,0 mg L⁻¹ mantendo-se a incubação no escuro. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo para o híbrido de orquídea, onde os melhores resultados também foram obtidos na ausência de luz, igual concentração da auxina e ausência de citocina no meio de cultivo, uma vez que não houve significância para as concentrações testadas deste fitorregulador.

TABELA 3 Número de internós de plântulas de uma espécie nativa e um híbrido de orquídea em diferentes ambientes de cultivo (Luz artificial e escuro) sob a influência de concentrações de BAP (0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) após 150 dias de inoculação *in vitro*.

Orquídea nativa								
Ambiente de cultivo	BAP (mg L ⁻¹)				ANA (mg L ⁻¹)			
	0	2	4	Médias	0	1	2	Médias
Luz	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B
Escuro	7,31aA	5,83bA	6,13bA	6,42A	5,55bA	6,28bA	7,40aA	6,42A
Médias	3,65a	2,91b	3,06b		2,77c	3,14b	3,7a	
CV (%)	35							
Orquídea híbrida								
Luz	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B
Escuro	5,29aA	4,71aA	5,57aA	5,19A	5,36bA	5,78bA	4,76aA	5,19A
Médias	2,64a	2,35a	2,78a		2,68a	2,89a	2,38a	
CV (%)	40							

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos no presente trabalho para ambas as espécies demonstram o efeito benéfico da adição de ANA ao meio de cultura para a variável número de internós com incubação no escuro. Tais observações se devem, muito provavelmente, à ação estimuladora de intensa divisão celular

proporcionada pelas auxinas (Suzuki et al., 2004), fazendo com que potencialize a condição de escuro onde muitas plantas apresentam estiolamento caulinar. Esta é uma vantagem no processo de micropropagação, uma vez que, em escala comercial, obtém-se maior número de plantas, pois cada nó apresenta uma gema lateral, que poderá dar origem a um novo broto ou explante (Kerbaui et al., 1995).

Segundo Ramos & Carneiro (2007), resultados semelhantes foram obtidos em estudos com *Cattleya mesquitate*, utilizando-se a mesma concentração de ANA, porém com a obtenção de reduzido número de nós que foram atribuídos ao pequeno período de incubação no escuro, o que leva a concluir que, havendo continuidade do cultivo *in vitro*, as gemas axilares presentes nos nós poderiam originar novas brotações, ou seja, seriam fontes de novos explantes a cada nó formado. A adição de 2,0 mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultura para a propagação *in vitro* de gengibre também influenciou significativamente o aumento da produção de nós por explante (Arimura et al., 1997). Em micropropagação de abacaxizeiro, Barboza (1999) obteve até dezesseis nós por broto caulinar estiolado, ao passo que Moreira et al. (2003) observaram brotos estiolados de aproximadamente 12 cm, que apresentaram entre dez e doze nós.

4 CONCLUSÕES

1. O número de brotos e de internós em plântulas da orquídea (nativa e híbrida) foi significativamente superior no ambiente em ausência de luz independente da concentração do fitorregulador utilizado.
2. Para a espécie nativa (*Laelia crispata*), maior número de internós foram obtidos com a utilização de 2,0 mgL⁻¹ de ANA na ausência de BAP.
3. Em relação à espécie híbrida [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach], maior número de internós foi obtido com a utilização de 2,0 mgL⁻¹ de ANA.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMURA, C. T.; FINGER, F. L.; MARIA, J. Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 6., 1997, Belém. **Resumos...** Belém: SBFV, 1997. p. 82.

BARBOZA, S. B. S. C. **Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro, *Ananas comosus* (L.) Merril.** 1999. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, mar. 2001.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; TEIXEIRA, A. L. de A.; GOMES, E. S.; HERNANDEZ, F. F. F. Ácido giberélico (GA3) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de Macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 934-938, jul./ago. 2003.

FARIA, R. T.; STANCATO, G. C. Orquídea-semeadura. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Coord.). **Micropropagação de plantas ornamentais.** Campinas: IAC, 1998. p. 37-39, 72 p. (Boletim Técnico, 174).

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3:** sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI-CNPH, 1998. p. 183-260, 509 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagation de plantas:** principios y practices. México: Continental, 1990. 760 p.

KERBAUY, G. B.; COLLI, S. I.; MAJEROWICZ, N. Manutenção da atividade meristemática apical em caules de *Catasetum* (Orchidaceae) pelo etileno: implicações com uma nova estratégia de micropropagação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1995. p. 3.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 14, n. 5, p. 214-217, Jan. 1946.

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 36, n. 2, p. 102-107, Mar. 2000.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, set./out. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

QUISEN, R. C. Multiplicação *in vitro* de bananeira cv. Pelipita (ABB) e cv. Prata Ken (AAAB). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. 1 CD-ROM.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “in vitro” de *cattleya x mesquítae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 10-15, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N. Otimização de meio de cultura para a bananeira (*Musa cavendishii* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 51-59, jan. 1996.

SUZUKI, R. M. **Efeito hormonal endógeno e exógeno sobre o desenvolvimento de plantas de *Catsetum fimbriatum* (Orchidaceae) incubadas na presença e ausência de luz**. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catsetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 8, p. 929-935, Aug. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. R.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C. L.; CALDAS, S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI-CNPH, 1998. v. 1, p. 133-145, 509 p.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, n. 17, p. 605-617, Jan. 1949.