

**INDUÇÃO DE TETRAPLÓIDES E
ALONGAMENTO DE PLANTAS DE
Dendrobium nobile LINDL. (ORCHIDACEAE)**

MÍVIA ROSA DE MEDEIROS VICHATO

2005

MÍVIA ROSA DE MEDEIROS VICHATO

**INDUÇÃO DE TETRAPLÓIDES E ALONGAMENTO DE PLANTAS DE
Dendrobium nobile LINDL. (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2005

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

Vichiato, Mívia Rosa de Medeiros.

Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae) / Mívia Rosa de Medeiros Vichiato. – Lavras : UFLA, 2005.

80p.: il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Orquídea. 2. *Dendrobium*. 3. Planta ornamental. 4. Melhoramento genético. 5. Duplicação cromossômica. 6. Poliploidia. 7. Cromossomo. 8. Citogenética. 9. Colchicina. 10. Análise estomática. 11. Frequência estomática. 12. Índice estomático. 13. Alongamento de plantas. 14. Ácido giberélico. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635-93415

MÍVIA ROSA DE MEDEIROS VICHATO

**INDUÇÃO DE TETRAPLÓIDES E ALONGAMENTO DE PLANTAS DE
Dendrobium nobile LINDL. (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 25 de abril de 2005

Prof. Dr. Daniel Melo de Castro	UFLA
Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra	EMBRAPA CNPF
Prof. Dr. Juscélio Clemente de Abreu	UNINCOR
Prof. Dr. Sandro Barbosa	UNINCOR

Prof. Dr. Moacir Pasqual (UFLA)
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha mãe,
Darci Angélica Henriques, pessoa mais forte que encontrei na vida;
Esposo,
Marcelo Vichiato, pelo amor que nos une;
Avós,
Miguel Henriques da Silva, Rosa Angélica do Prado e Vitalina G. de Jesus;
Irmãos e cunhados,
Elbinho, Inhá, Myrinha, Marilda, Alex, Bell, Vaninha, Elder e Tê;
Sobrinhos,
Matheus, Arthur, Gabriela, Laryssa, Antônio e João,
ancoradouro seguro durante todos estes anos.
A São Francisco de Assis, protetor dos animais, por meus filhos maravilhosos:
Bia, Tininho, Leo, Jade, Chiara, Zafir, Yasmin, Thor e Letícia.
Amo todos vocês!

OFEREÇO

Aos meus *Walfridos*, pai e irmão,
que partiram durante o curso de doutorado, quantas saudades!

“Onde vá, onde quer que vá

leva o coração feliz

toca a flauta da alegria, como doce menestrel.

Onde vá, onde quer que vá, vou estar de olho atento

À sua menor tristeza, por no seu sorriso o mel.

Onde vá, vá para ser estrela

As coisas se transformam e isso não é bom nem é mau.

E onde quer que eu esteja, o nosso amor tem brilho

Vou ver o seu sinal”

(Por brilho, Oswaldo Montenegro)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade concedida para a realização deste curso de Doutorado.

À Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, que viabilizou a realização deste curso.

Aos colaboradores deste trabalho: Moacir Pasqual, Daniel Melo de Castro e Leonardo Ferreira Dutra, pela amizade, ensinamentos, orientação na execução deste trabalho e incentivo na realização do curso.

Aos professores da UFLA: Evaristo Mauro de Castro, Renato Mendes Guimarães, Édila Von Pinho, Samuel Pereira de Carvalho, José Darlan Ramos e Lisete Chamma Davide, pelos ensinamentos.

Aos amigos e funcionários dos laboratórios de Citogenética, Anatomia Vegetal e Cultura de Tecidos, pelo apoio, carinho e amizade em especial aos alunos de Biologia, meus “filhotes”: Walter Marchiori Júnior, Carolina Delfim Fernandes Lima e Caio César Salgado.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, pela amizade e auxílio.

Às secretárias do Departamento de Agricultura Nelzy, Adriana, Raquel e Cida, pela paciência e colaboração.

Aos amigos Adelson Nascimento Oliveira, Maria das Graças Ribeiro (D.Fia), Ivonilde Ozólio Mayrink e Germino, Bárbara Dantas e Wellington, Vanessa Theodoro, Antonio Claret, Júlio César Garcia e Bel, Vandeir Gregório Alves, Hermínio S. Rocha e família, Fabíola Villa e Chiara: “amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito”.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho; e se fosse citar todos, não caberiam nesta folha.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1 - Poliploidia, análise estomática e alongamento de plantas de <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. (Orchidaceae)	
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	02
2.1 <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	02
2.2 Caracterização citogenética de <i>Dendrobium</i>	03
2.3 A poliploidia no melhoramento genético de orquídeas	06
2.4 Obtenção de poliplóides artificiais de orquídeas	08
2.5 Métodos de determinação do nível de ploidia	10
2.6 A relação entre ecologia e poliploidia em orquídeas	12
2.7 O ácido giberélico no alongamento de plantas	14
Referências Bibliográficas	16
CAPÍTULO 2 - Indução e identificação de poliplóides em <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	
1. Resumo	24
2. Abstract	25
3. Introdução	26
4. Material e Métodos	29
5. Resultados e Discussão	32
6. Conclusões	40
7. Referências Bibliográficas	40

CAPÍTULO 3 - Análises estomática e de crescimento em plantas diplóides e tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl..

1. Resumo	45
2. Abstract	46
3. Introdução	47
4. Material e Métodos	51
5. Resultados e Discussão	54
6. Conclusões	61
7. Referências Bibliográficas.....	61

CAPÍTULO 4 - Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com aplicação de ácido giberélico.

1. Resumo	66
2. Abstract	67
3. Introdução	68
4. Material e Métodos	69
5. Resultados e Discussão	70
6. Conclusões	75
7. Referências Bibliográficas	76
ANEXOS	79

RESUMO

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. **Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras -MG.¹

O presente estudo foi desenvolvido no campus da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, no período de janeiro de 2003 a fevereiro de 2005, objetivando a indução e identificação de poliplóides, a análise estomática em folhas diplóides ($2n=2x=38$) e tetraplóides ($2n=4x=76$), bem como o alongamento com aplicação de ácido giberélico em plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. Na indução de poliplóides, plantas intactas de *D. nobile* foram completamente imersas em solução de colchicina a 0,05% e 0,1% por 24, 48, 72 e 96 horas. Para a identificação das plantas poliplóides, via análise citogenética, ápices radiculares foram pré-tratados em água gelada por 24 horas, fixados em solução de ácido acético: clorofórmio: etanol 95% (1:3:6) a 4°C por 24 horas e submetido à técnica de esmagamento convencional. A coloração foi feita com solução de Giemsa a 3% com tampão fosfato pH 6,8. No segundo experimento, para a análise estomática em microscopia de luz, folhas completamente expandidas do 3º nó foram fixadas em FAA₅₀ e submetidas aos procedimentos usuais em microtécnica vegetal. Os cortes paradérmicos foram corados com safranina 1%. Para a descrição dos estômatos em microscopia eletrônica de varredura, as folhas, nas mesmas condições descritas para a microscopia de luz, foram cortadas em segmentos de 2 x 2 cm. O material foi fixado em solução

¹ Comitê orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA (orientador), Prof. Dr. Daniel Melo de Castro-UFLA e Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro -UFLA.

aquosa de Karnovsk, pH 7,2 por 24 horas, pós-fixado com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,1 M e desidratado com série crescente de acetona. Posteriormente, o material foi seco até o ponto crítico e, em seguida, aderido a blocos especiais (“stubs”) e recoberto com uma camada de ouro metálico. No terceiro experimento, para o alongamento de plantas de *D. nobile* com aplicação de ácido giberélico, plantas intactas com altura média de 4,74 cm receberam, quinzenalmente, quatro pulverizações com quatro concentrações de GA₃ (50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹). Concluiu-se que a indução de poliploidia em *D. nobile*, mediante imersão das plantas em solução de colchicina é satisfatória, obtendo maior número de indivíduos poliplóides (29,17%) na concentração 0,1% por 96 horas. O tamanho dos estômatos de *D. nobile* é inversamente proporcional ao nível de ploidia. Os estômatos de *D. nobile* são do tipo I, com abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas. As plantas tetraplóides obtidas têm menor crescimento que as diplóides. O ácido giberélico nas concentrações de 50 a 400 mg.L⁻¹ é igualmente eficiente no alongamento de plantas.

ABSTRACT

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. **Tetraploids induction and elongation of *Dendrobium nobile* Lindl. plants (Orchidaceae)**. 2005. 80p. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Lavras Federal University. Lavras -MG.¹

The present study was developed at the campus of the Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, over period from January of 2003 to February of 2005, aiming at, for *Dendrobium nobile* Lindl., the induction and polyploidys identification, the stomatal analysis in diploid ($2n=2x=38$) and tetraploids ($2n=4x=76$) leaves, as well as the plant elongation with gibberellic acid application. In the first experiment, intact plants of *D. nobile* were completely submerged in 0,05% or 0,1% colchicine solution during 24, 48, 72 or 96 hours. For the polyploids plants identification by cytogenetics analysis, tips roots were pre-treatment in cold water for 24 hours, fixed in solution of acetic acid: chloroform: ethanol 95% (1:3:6) to 4°C for 24 hours and submitted to the conventional crushing technique The staining was done with solution of Giemsa 3% with phosphate buffer pH 6,8. In the second experiment, for the stomatal analysis in light microscopy, completely expanded leaves of the 3^o knot were fastened in FAA₅₀, submitted to the usual procedures in vegetable and staining with safranin 1%. For the stomatal analysis in scanning electron microscopy, the leaves in the same conditions described for the light microscopy, were cut in 2 x 2 cm segments. The material was fixed in Karnovisk solution, pH 7.2 for 24 hours, pos-fixed with aqueous solution of tetroxid of osmio 1%, in cacodilato buffer 0,1 M, for 1 hour and dehydrated with growing series of acetone. Later, the material was dried until the critical point and, soon after, it was stuck to

¹ Guidance committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Daniel Melo de Castro – UFLA and Evaristo Mauro de Castro -UFLA.

special blocks ("stubs") and covered with a metallic gold layer. In the third experiment, for the prolongation of plants of *D. nobile* with gibberellic acid application, intact plants with medium height of 4.74 cm received four pulverizations biweekly with four concentrations of GA₃ (50, 100, 200 and 400 mg.L⁻¹). It was concluded that the polyploidy induction in *D. nobile*, by immersion of the plants in colchicina solution is viable, obtaining larger number of individuals polyploidys (29,17%) in the 0,1% concentration by 96 hours. The *D. nobile* plants presented elliptic stomata with lateral gradually tilted, being the stomatal size inversely proportional at the ploidy level. The polyploidys plants presented smaller growth when compared with the diploid ones. The acid giberélico in the concentrations from 50 to 400 mg.L⁻¹ is equally efficient in the prolongation of plants.

CAPÍTULO 1

Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)

1 Introdução Geral

Dendrobium nobile Lindl. (olho de boneca) é uma das orquídeas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso. O considerável interesse por esse gênero é devido a sua larga distribuição geográfica, ciclo curto, volume expressivo de comercialização, cultivo relativamente simples, crescimento em diferentes habitats e, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos.

O aumento da variabilidade genética em orquídeas pode ser obtido pela duplicação cromossômica. A poliploidia foi um fator importante no desenvolvimento de variedades comerciais melhoradas de híbridos de orquídeas, pois geralmente promove o aumento do tamanho da flor e a intensificação da cor e perfume, bem como na restauração da fertilidade de híbridos raros. Contudo, a dificuldade na identificação precisa do nível de ploidia das plantas induzidas à poliploidização, tem se constituído em obstáculo considerável ao trabalho de melhoramento genético de orquídeas.

Em experimentos de duplicação cromossômica, a determinação do nível de ploidia deve ser preferencialmente através da análise citogenética ou da citometria de fluxo. Como a endopoliploidia é freqüente no gênero *Dendrobium*, a citometria de fluxo em *D. nobile* não é segura na identificação de diferentes níveis de ploidia. A contagem de cromossomos é um método laborioso e demorado, sendo desvantajoso quando se trata de análises em grande número de

plantas. Por isso, a análise estomática é normalmente empregada como parâmetro para a distinção entre os diferentes níveis de ploidia, uma vez que o comprimento do estômato normalmente aumenta com o número de cromossomos. No entanto, as características estomáticas são afetadas não somente pelo nível de ploidia, mas também por outros fatores genéticos e ambientais.

O desenvolvimento muito lento das plantas da família Orchidaceae, outro obstáculo no melhoramento genético de orquídeas, tem contribuído para o elevado valor unitário de suas plantas, sendo necessárias técnicas que promovam a obtenção mais rápida de plantas comercializáveis. A giberelina GA₃ (ácido giberélico) é um hormônio que atua nas plantas como estimulante de crescimento, originando plantas de maior tamanho em consequência da sua ação na divisão e expansão celulares. No entanto, a pulverização com giberelina ainda não foi utilizada para o alongamento das plantas intactas de orquídeas.

O presente estudo foi realizado objetivando, para *Dendrobium nobile* Lindl., a indução e identificação de plantas duplicadas, as análises estomática e de crescimento em folhas diplóides ($2n=2x=38$) e tetraplóides induzidos ($2n=4x=76$), bem como o alongamento de suas plantas com aplicação de ácido giberélico.

2. Referencial Teórico

2.1 *Dendrobium nobile* Lindl.

É uma espécie pertencente à subclasse Monocotiledoneae, família Orchidaceae, que inclui cerca de 775 gêneros, 3.5000 espécies e um grande número de híbridos, cujo número cresce a cada dia. No Brasil foram identificados, aproximadamente, 191 gêneros e 2.400 espécies. A família, uma das maiores dentre as Fanerógamas, constitui aproximadamente 40% das

Monocotiledôneas e ocorre em quase todas as regiões do planeta (Felix, 2001; Barros, 2002; Menini Neto et al., 2004).

O gênero *Dendrobium* apresenta mais de 1000 espécies, sendo considerado um dos maiores da família Orchidaceae. O considerável interesse por esse gênero é devido, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos e volume expressivo de comercialização (Jones et al., 1998).

A espécie *D. nobile*, originária da China e Himalaia, é uma herbácea epífita, perene, micotrófica, entouceirada, de 30-45 cm de altura. Possui pseudobulbos sulcados longitudinalmente, verde-amarelados, com nós e entrenós. Nos nós aparecem de uma a três flores que se desenvolvem geralmente nos dois terços superiores dos pseudobulbos maduros. As flores, formadas no inverno-primavera, apresentam sépalas e pétalas brancas, róseas ou amareladas e labelo com mancha roxo-escuro ou clara. São citados mais de quinze cultivares, nas quais variam o tamanho e a cor das flores (Campos, 2000; Lorenzi e Souza, 2001).

É tolerante ao frio e pode ser cultivado em vasos com substratos a base de fibra de coco, bucha vegetal, bagaço de cana-de-açúcar, esfagno, fibra de xaxim ou afixado em bucha vegetal, palito de xaxim ou em ramos de árvores a pleno sol ou a meia-sombra, sendo irrigado quando necessário (Lorenzi e Souza, 2001; Vichiato et al. 2004a, Vichiato et al. 2004b). Multiplica-se por divisão de touceira (keikis) e por separação das inúmeras brotações laterais nos pseudobulbos (Lorenzi e Souza, 2001).

2.2 Caracterização citogenética de *Dendrobium*

O conhecimento dos componentes estruturais, funcionais e comportamentais dos cromossomos é de suma importância para o entendimento da biodiversidade e dos processos evolutivos e para a manipulação genética em programas de melhoramento (Sharma e Sharma, 1999).

A citogenética é uma ciência especializada da genética que estuda a relação entre os eventos celulares, especialmente aqueles relacionados aos cromossomos, com os eventos genéticos e fenotípicos. Entre os assuntos mais detalhados pela citogenética encontram-se os estudos sobre as variações numéricas e estruturais dos cromossomos (Guerra, 1989; Sharma e Sharma, 1999).

A família Orchidaceae, considerada a mais evoluída e nume rosa de todo o reino vegetal, possui ampla adaptação, sendo encontrada em todos os continentes, com exceção das regiões polares. Apresenta alta diversidade cromossômica numérica, uma característica comum a outras grandes famílias como Poaceae e Asteraceae (Felix, 2001).

Embora as orquídeas sejam um interessante material de estudo citogenético, sendo freqüentes a poliploidia, aneuploidia e cromossomo B, pouco ainda se sabe a respeito da cariomorfologia das espécies desta família, (Tanaka e Kamemoto, 1980; Vosa, 1983). Schwarzacher et al. (1980) estimaram que, das 35.0000 espécies existentes de orquídeas, somente 5% foram analisadas citogeneticamente. O conhecimento a respeito da citogenética em Orchidaceae de ambientes tropicais é ainda mais limitado (Dematte is e Daviña, 1999; Farinaci, 2001; Felix, 2001). Os estudos cromossômicos nas orquídeas estão voltados principalmente para a obtenção de híbridos com características hortícolas desejáveis, os quais, normalmente, estão relacionados à poliploidia (Arditti, 1992).

O pequeno volume de informação deve-se à dificuldade de obtenção de preparações citológicas de boa qualidade, que permitam o espalhamento e a diferenciação dos cromossomos, possibilitando a identificação de centrômeros, das constrições secundárias e dos satélites. Isso é devido ao fato que, em orquídeas, geralmente é difícil despolimerizar o fuso mitótico por meio dos pré-tratamentos comuns, provavelmente pela morfologia das raízes com velame das

epífitas. Das diferentes metodologias para análise de cromossomos de orquídeas, a maioria utiliza botões florais, o que é inviável em programas de melhoramento genético, uma vez que a orquídea demora, em média, sete anos para florescer (Vosa, 1983; Mondin, 1998; Dematteis e Daviña, 1999).

Para a análise citogenética em meristemas radiculares, algum progresso foi feito, nos últimos anos, pela introdução dos métodos de esmagamento e maceração dos tecidos com enzimas que degradam a parede celular. Apesar da inevitável desvantagem do grande número de cromossomos de tamanho muito pequeno, com muitas aderências, dificultando a visualização de sua morfologia, a citologia das orquídeas tem grande potencial nos estudos de afinidades taxonômicas, relações evolucionárias e em programas de melhoramento genético (Tanaka e Kamemoto, 1980; Dematteis e Daviña, 1999; Farinaci, 2001).

A variação nos números cromossômicos tem sido o parâmetro citotaxonômico mais extensamente empregado em vegetais. Em orquídeas, por causa das características de seus cromossomos, essa tem sido a abordagem citológica dominante para a família como um todo (Brandham, 1999). A variação cromossômica numérica é ampla, desde $2n=10$ em *Psychmorchis pusilla* até $2n=200$ em *Aerangis*. O predomínio de $2n=38$, 40 e 42 , na maioria das orquídeas, e o registro de $n=5$ em *Psychmorchis* e $n=10$ em vários outros gêneros, têm sugerido $x=5$ ou $x=10$ como número básico de cromossomos para a família (Felix, 2001).

A ampla variação no número cromossômico das orquídeas tem trazido uma contribuição importante para a compreensão da taxonomia e evolução da família. No gênero *Polystachya*, por exemplo, apenas as espécies americanas apresentam $x=44$ cromossomos, enquanto as espécies do Velho Mundo têm número básico $x=20$, sugerindo diferentes estratégias de evolução cromossômica no gênero (Jones, 1966).

Embora os primeiros registros sobre o número cromossômico das espécies de *Dendrobium* datem de 1929, atualmente há pouca informação citogenética publicada para o gênero. Na literatura, das 140 espécies de *Dendrobium* analisadas, 116 eram $2n=38$, 21 eram $2n=40$, 2 eram $2n=76$, sendo que em *D. kingianum* o número cromossômico variou de $2n=38$ a $2n = 114$ cromossomos (Shindo e Kamemoto, 1963; Wilfret e Kamemoto, 1969, Wilfret e Kamemoto 1971; Wilfret et al., 1979; Karassawa e Hashimoto, 1980; Jones, 1982; Hashimoto, 1987; Mehra e Kashyap, 1989; Jones et al., 1998). Segundo Löve et al. (1970) e Mehra e Kashyap (1989), os cromossomos B foram descritos para poucas espécies do gênero, como em *D. bicameratum* ($n = 19 + 4B$), *D. anceps* ($n = 19 + 2B$) e *D. densiflorum* ($n = 20 + 2 B$). A espécie *D. nobile* geralmente apresenta $2n=2x=38$ cromossomos, não sendo detectado cromossomo B (Karassawa e Hashimoto, 1980; Jones, 1982; Hashimoto, 1987).

Wilfret e Kamemoto (1971) mostraram que, apesar da maioria das espécies de *Dendrobium* apresentar números de cromossomos uniformes de $2n=2x=38$, os mesmos muitas vezes não são semelhantes, podendo os cariótipos ser usados para diferenciar as espécies. Segundo esses autores, a diferença entre os cariótipos de *D. biggibum* e *D. phalaenopsis*, ambos com 38 cromossomos, está no tamanho de três pares de cromossomos, bem maiores em *D. biggibum*.

2.3 A poliploidia no melhoramento genético de orquídeas

A poliploidia nas plantas ocasiona, geralmente, aumento de tamanho das estruturas vegetativas (efeito “gigas”), beneficiando a orquicultura, uma vez que o aumento da variabilidade genética resultou em flores de maior valor comercial, normalmente de maior tamanho, com conformação mais redonda, maior conteúdo de substâncias que resultam na intensificação da cor e fragrância, quando comparadas com as orquídeas diplóides. Também é uma ferramenta útil na restauração da fertilidade de híbridos com problemas na formação do

complexo sinaptonêmico dos cromossomos durante a meiose (Blumenschein, 1957; Griesbach, 1985; Brieger, 1992; Dressler, 1993; Gao et al., 1996; Toscano e Moraes, 2002; Fam et al., 2003).

A duplicação cromossômica é importante no desenvolvimento de variedades comerciais melhoradas e híbridos de orquídeas (Blumenschein, 1957) e, por causa das características vantajosas das flores poliplóides, cruzamentos entre plantas poliplóides são freqüentemente realizados por fitomelhoristas. Assim sendo, a análise citogenética em orquídeas é uma importante e imprescindível ferramenta em programas de melhoramento genético.

Uma série de efeitos morfofisiológicos é esperada pela poliploidização. O efeito imediato é o aumento do tamanho das células devido ao volume nuclear maior, conduzindo a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento. O conhecido efeito “gigas” encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado como flores e sementes. As características gerais apresentadas por plantas poliplóides incluem folhas e pétalas mais grossas, firmes e de coloração mais escura, estômatos maiores e menos freqüentes, menor ramificação, retardamento no ciclo mitótico e conseqüente retardamento de floração e frutificação (Roth, 1984; Griesbach, 1985; Brieger, 1992; Dressler, 1993; Takamura e Miyajima, 1996; Toscano e Moraes, 2002).

Geralmente a poliploidização é induzida para contornar a esterilidade cromossômica dos híbridos interespecíficos. Entretanto, ela pode também ser utilizada para induzir a esterilidade. Nesse caso, são induzidos níveis de ploidia ímpar, em geral triplóides ou pentaplóides. Indivíduos com ploidia ímpar são normalmente estéreis (Guerra, 1989).

As plantas com nível de ploidia não muito elevado (até 6x) são mais interessantes por serem férteis e apenas um pouco mais tardias no desenvolvimento. Isso porque, apesar das plantas tri e tetraplóides serem mais

vigorosas que as diplóides normais, ocorre o "efeito de dose" dos genes, onde até um determinado limite ganha-se vigor e precocidade, mas passado este limite gasta-se muita energia e tempo na duplicação do próprio DNA, o que retarda os ciclos vitais, que expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo. Plantas com nível de ploidia muito alto (como as octoplóides, por exemplo) chegam a ser quatro vezes mais lentas para atingir a maturidade, e o resultado dessa ploidia elevada nem sempre é compensador (Dressler, 1993).

2.4 Obtenção de poliplóides artificiais de orquídeas

Em plantas, a duplicação dos cromossomos pode ser induzida de diversas maneiras. Ferimento de tecidos com posterior regeneração e choques térmicos eram as técnicas mais antigas (Roth, 1984).

A colchicina, um alcalóide extraído principalmente de bulbos da liliácea *Colchicum autumnale* (cólquico), tem sido usada desde 1937 na indução de plantas poliplóides (Havas, 1937), sendo ainda a substância mais amplamente empregada para indução de poliploidia em programas de melhoramento genético de culturas agrícolas, espécies florestais e plantas ornamentais (Roth, 1984; Sharma e Sharma, 1999; Silva et al., 2000).

O mecanismo de ação da colchicina é conhecido. Ela liga-se reversivelmente ao dímero de tubulina α e β , causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase. Como os sítios específicos, aos quais a colchicina se liga aos dímeros α e β , são inacessíveis quando a tubulina está polimerizada na forma de microtúbulos, tal substância atua na tubulina solúvel, impedindo-a de se polimerizar. Em microtúbulos já formados, a colchicina impede o crescimento destas estruturas durante a divisão celular (Mergen e Lester, 1971; Roth, 1984; Morejohn et al., 1987; Sluder, 1991).

Em orquídeas, a colchicina foi usada pela primeira vez em 1947, surgindo vários relatos sobre a aplicação de colchicina em orquídeas, mas a maioria não fornece nenhum dado a respeito do número de cromossomos (Arditti, 1992). Esse alcalóide a 0,05% e 0,1% é considerado a substância mais eficiente na indução de poliploidia de orquídeas (Sanguthai et al., 1973; Griesbach, 1985; Waltrous e Wimber, 1988; Silva et al., 2000; Fam et al.; 2003). A poliploidia de orquídeas é normalmente alcançada tratando protocormos com colchicina; porém, nem todos os poliplóides são considerados mais atraentes que as originais (Fam et al., 2003).

Silva et al. (2000) testaram colchicina a 0,05; 0,10 e 0,20% em diferentes tempos de exposição ao alcalóide, via cultura de meristema (4 ou 8 dias), para determinar o melhor tratamento para a indução de plantas poliplóides da orquídea *Cattleya intermedia*. Esses autores concluíram que os tratamentos com 0,05% e 0,10% de colchicina foram mais eficientes na produção de mixoplóides e tetraplóides, sugerindo esses tratamentos em programas de melhoramento genético de orquídeas.

Sanguthai et al. (1973) produziram, via cultura de meristema, híbridos de *Dendrobium* hexaplóides e mixoplóides com soluções de colchicina a 0,05%, 0,10% e 0,15%, sendo a concentração mais efetiva de 0,10%. Waltrous e Wimber (1988), tratando protocormos de *Paphiopedilum* com colchicina a 0,05%, produziram 55% de plantas tetraplóides. Griesbach (1985) obteve 50% de plantas tetraplóides tratando *Phalaenopsis* com colchicina a 0,05%, porém por um período de tempo mais prolongado (10-14 dias). É recomendado curto período de tratamento com colchicina, não excedendo 10 dias (Silva et al., 2000; Waltrous e Wimber, 1988; Sanguthai et al.; 1973).

A importância da colchicina está relacionada com a sua ação específica, que é a duplicação cromossômica. Entretanto, se não for removida em tempo oportuno, pode provocar anomalias cromossômicas como de leção, quebras e

cromossomos atrasados e pegajosos, em consequência da despolimerização do fuso. Em concentrações elevadas, a colchicina possui efeitos tóxicos, gerando grande mortalidade nas plantas tratadas, sendo que a tolerância a colchicina varia entre as espécies (Roth, 1984; Wan et al., 1989; Abreu, 2002; Barbosa, 2004).

O maior problema da indução via colchicina resulta do fato que a substância somente atua eficientemente sobre as células que estão em divisão. Desse modo, a poliploidização geralmente não atinge todas as células do material tratado, sendo comum o aparecimento de mixoplóides. Em consequência, surge o problema relativo à reversão parcial ou total à condição diplóide, após alguns ciclos de divisão, principalmente devido à proliferação das células diplóides remanescentes que se multiplicam a taxas superiores às das células poliplóides. Por isso, tem-se variado bastante a forma de aplicação dos indutores de poliploidia, buscando uma maior eficiência do tratamento (Roth, 1984).

2.5 Métodos de determinação do nível de ploidia

A determinação do nível de ploidia, em plantas submetidas à duplicação cromossômica, pode ser realizada diretamente por meio da contagem do número de cromossomos em células mitóticas ou meióticas (Guerra, 1989; Villa, 1995).

No entanto, a análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, sendo um procedimento laborioso e demorado, desvantajoso quando se trata de análises em grande número de plantas (Qin e Rotino, 1995; Villa, 1995; Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999).

Existem grandes dificuldades na elaboração de protocolos para preparações citológicas em orquídeas, devido a grande variabilidade das características morfológicas das espécies. Assim, fica claro o porquê da literatura conter pequena quantidade de trabalhos que descrevam protocolos,

como os de Mehlquist (1947), Tanaka e Kamemoto (1980) e Schwarzacher et al. (1980), que tentaram padronizar uma metodologia eficiente para todas as espécies de orquídeas.

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica, ou seja, a avaliação de determinadas características da planta, tais como os aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares. Esse método pode ser útil para inferir o nível de ploidia de plantas submetidas à indução de poliploidia, sendo a análise estomática a mais citada na literatura (Tan e Dunn, 1973; Lleras e Medri, 1978; Medri e Lleras, 1981; Villa, 1995; Vandenhout et al., 1995; Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004).

As análises morfológicas e citoanatômicas são métodos relativamente fáceis e rápidos para avaliação do nível de ploidia e permitem estimativas de correlações estatísticas (Pehu et al., 1987; Souza e Queiroz, 2004). A associação entre o nível de ploidia e características morfológicas pode auxiliar na separação de plantas poliplóides, principalmente porque essas características estão relacionadas com o aumento do tamanho das células, como resultantes da poliploidização (Lleras e Medri, 1978; Medri e Lleras, 1981; Villa, 1995; Magallanes et al., 1996; Souza e Queiroz, 2004).

Fam et al. (2003) observaram que plantas tetraplóides do híbrido de *Ionocidium* “Popcorn” apresentaram folhas maiores e mais vigorosas, com estômatos de maior tamanho e flores também maiores, com coloração mais intensa e de maior vigor, quando comparadas com as diplóides. Silva et al. (2000), que estimaram o nível de ploidia de *Cattleya intermedia* através da análise citogenética e estomática, observaram que a análise estomática é segura na identificação de plantas poliplóides nessa espécie.

No entanto, vários autores enfatizaram que os métodos indiretos podem ser influenciados pelo ambiente e a análise individual de algumas variáveis poderá ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004). Além disso, os métodos indiretos possibilitam apenas distinção entre indivíduos poliplóides e diplóides, não sendo útil para detectar, por exemplo, triplóides de tetraplóides (Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999). Mesmo assim, a aplicação dos métodos indiretos é importante, uma vez que o descarte das plantas diplóides possibilitará considerável redução do número de plantas a serem submetidas à análise citogenética, reduzindo custos e acelerando o processo de seleção (Souza e Queiroz, 2004).

2.6 A relação entre ecologia e poliploidia em orquídeas

Os padrões evolutivos na família Orchidaceae estão relacionados às características do habitat, especiação floral e micotrofia (Benzing, 1987). Essa família é predominantemente epífita, possuindo cerca de 30% de seus representantes com habitats terrestres (Benzing e Atwood, 1984). Entre essas últimas predominam grupos mais primitivos (subfamílias Apostasioideae e Cypripedioideae), que possuem geralmente habitats terrestres e ambientes úmidos (Félix, 2001).

Em termos citológicos, esses grupos de orquídeas mais primitivos se destacam por apresentar números cromossômicos relativamente baixos. Curiosamente, as espécies terrestres mais primitivas de *Cypripedium* ($2n=20$) e várias espécies de *Cleistes* e *Pogonia* (ambas com $2n=18$), possuem cromossomos maiores e cariótipo simétrico. As demais orquídeas terrestres de ambientes méxicos e xéricos, bem como as epífitas em geral, ao contrário das terrestres de ambientes úmidos, possuem cromossomos menores e níveis de ploidia elevados (Félix, 2001).

A natureza poliplóide das orquídeas terrestres mais evoluídas ou epífitas parece ter sido precedida pela ocorrência de números cromossômicos baixos, como em *Cypripedium* e na subtribo Pogoniinae. Essas plantas de ambientes úmidos derivaram para ambientes terrestres mais xéricos ou para o epifitismo, em ambos os casos acompanhados por repetidos ciclos de poliploidia. Orquídeas epífitas que aparentemente reverteram ao habitat terrestre, como nos gêneros *Cyrtolaelia* e *Oncidium*, tiveram seu nível de ploidia ainda mais aumentado (Felix, 2001). Felix e Guerra (2000) observaram que nos gêneros *Catasetum* e *Oncidium*, as espécies terrestres e rupícolas apresentaram níveis de ploidia superiores àqueles das espécies epífitas, sugerindo que a poliploidia pode estar envolvida na capacidade de retornar ao habitat terrestre.

É amplamente aceito um ancestral terrestre para as orquídeas, pelo fato dos gêneros mais primitivos possuírem habitats terrestres. Todavia, a ocorrência de raízes com velame, processos elaborados de polinização e sementes diminutas em espécies terrestres, características mais apropriadas ao habitat epifítico, tem indicado um ancestral epifítico para as orquídeas. Em termos citológicos, o predomínio de representantes diplóides nos gêneros terrestres primitivos, aparentemente suporta a hipótese do ancestral terrestre para as orquídeas (Félix, 2001).

Funabiki (1976), citado por Roth (1984), trabalhando com diversas espécies demonstrou, com estudos evolutivos e em experimentos, que poliplóides naturais de muitas espécies surgiram em épocas de estresse ambiental, como frio ou seca, durante as eras de glaciação. Para o meio ambiente, a poliploidia em orquídeas também pode ser vantajosa, por possibilitar a ocupação rápida de novas condições ambientais que surgem com variações bruscas no ambiente (Blumenschein, 1957).

Os poliplóides podem, em longo prazo, adquirir grande amplitude ecológica através de um efeito “tampão” contra mudanças climáticas (Stebbins,

1971). Apoiando-se na distribuição da ocorrência de poliplóides em espécie normalmente diplóide, Gustafsson (1968), Lleras e Medri (1978) e Medri e Lleras (1981) sugerem uma relação entre a poliploidia e condições ecológicas, no sentido de maior valor adaptativo da poliploidia em condições ambientais adversas. Em orquídeas, a poliploidização também pode provocar alterações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários como alcalóides, terpenóides e flavonóides podendo, entre outras coisas, conferir maior resistência a patógenos e herbívoros (Farinaci, 2001).

Farinaci (2001) analisou três espécies do gênero *Bulbophyllum* de campos rupestres em diversas localidades nos Estados de Minas Gerais, Bahia e São Paulo e observou que a maioria das amostras coletadas era poliplóide. Provavelmente a poliploidia desempenha um papel importante na adaptação dos indivíduos com relação às variações nas restrições do ambiente em que vivem. Isto porque os campos rupestres representam um ambiente onde os organismos estão sujeitos a variações ambientais de grande amplitude, sendo esta condição ainda reforçada pelo hábito rupícola, que limita a disponibilidade de nutrientes e água, além da variação entre a temperatura diurna e noturna nas rochas ser severa.

Assim, a variabilidade resultante da poliploidia é potencialmente vantajosa, pois é capaz de alterar as características genéticas, citológicas, bioquímicas, fisiológicas e de desenvolvimento dos organismos, gerando macromutantes que oferecem às populações possibilidades de sobrevivência às variações de determinados ambientes (Roth, 1984; Farinaci, 2001).

2.7 O ácido giberélico no alongamento de plantas

As orquídeas, cultivadas tanto para produção de plantas de corte como de vaso, são consideradas as mais antigas espécies ornamentais (Sheehan, 1983; Faria e Illg, 1998; Fráguas et al., 2003).

No entanto, as plantas dessa família apresentam desenvolvimento muito lento, requerendo maior período de cultivo antes de serem comercializadas. Isso tem contribuído para o elevado valor unitário de suas plantas no mercado. Assim sendo, existe grande interesse na diminuição do tempo de formação da muda de orquídea, uma vez que isto acarretaria benefícios, principalmente na redução dos custos.

As giberelinas exercem efeitos positivos no alongamento de caules e folhas em plantas intactas mediante o estímulo tanto da divisão quanto do alongamento celular. A provável hipótese com relação ao mecanismo através do qual as giberelinas estimulam a expansão celular, é a hidrólise do amido. Elas podem gerar α -amilase que hidrolisa o amido, incrementando a produção de açúcares e elevando a pressão osmótica do suco celular, fazendo com que maior quantidade de água entre nas células e estas sejam expandidas (Cordeiro, 1979; Pires, 1998).

Em citros, vários trabalhos destacaram o efeito positivo da pulverização do ácido giberélico no alongamento do caule, resultando em plântulas maiores e, conseqüentemente, reduzindo o tempo para produção de mudas (Ben-Gad et al., 1978; Sidahmed, 1978; Muller e Young, 1982; Coelho et al., 1983; Leonel e Rodrigues, 1996). Resultados semelhantes foram obtidos em plântulas de girassol (Auras, 1997) e pessegueiro (Casper e Taylor, 1989).

Em orquídeas, a giberelina é comumente utilizada no meio de cultura *in vitro* visando estimular o desenvolvimento do embrião e também na indução do florescimento, mediante pulverização (Chen et al., 1994). Em plantas intactas de *Catasetum fimbriatum* cultivadas *in vitro*, o GA₃ não promoveu aumento dos pseudobulbos (Suzuki et al., 2004). No entanto, a pulverização com giberelina ainda não foi utilizada para o alongamento das plantas intactas de orquídeas.

Referências Bibliográficas

ABREU, J.C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante X milho tratados com agentes antimutogênicos**. 2002. 71p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ARDITTI, J. **Fundamental of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691p.

AURAS, N.E. **Efeitos do paclobutrazol sobre morfologia e anatomia foliar, crescimento de parte aérea, distribuição de biomassa e trocas gasosas em girassol**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho**. 2004. 119p. Tese (Doutorado Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARROS, F. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum* e *Heterotaxis* (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v.29, n.2, p.109-113, ago. 2002.

BEN-GAD, D.Y.; ALTMAN, A.; MONSELISE, S.P. The effects of root-applied GA₃ and SADH on the vegetative development of sweet lime seedlings, their assimilate distribution and starch content. **Israel Journal of Botany**, Tel-Aviv, v.27, n.1, p.40, 1978.

BENZING, D.J. Major patterns and processes in orchid evolution: a critical synthesis. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**. 4 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1987. p. 33-78.

BENZING, D.J.; ATWOOD, J.T. Orchidaceae: ancestral habitats and current status in forest canopies. **Systematic Botany**, Bronx, v.9, n.2, p. 155-165, 1984.

BLUMENSCHNEIN, A. **Estudo citológico da família Orchidaceae**. 1957. 86p. Tese (Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

BRANDHAM, P. Genera Orchidacearum, v.1: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE,

M.W.; RAMUSSEN, F.N. (Ed.). **Cytogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 67-80.

BRIEGER, A.H.N. **Caracterização morfológica e estudo da anatomia foliar de populações de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae)**. 1992. 79p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAMPOS, K.O. **Floração em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) e os níveis endógenos de citocininas, auxina e ácido abscísico**. 2000. 74p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CASPER, J.A.; TAYLOR, B.H. Growth and development of Young ‘Loring’ peach trees after foliar sprays of paclobutrazol and GA₃. **Hortscience**, Alexandria, v.24, n.2, p. 240-242, Abr. 1989.

CHEN, W.E.; LIU, H.Y.; LIU, Z.H.; YANG, L.; CHEN, W.H. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.2, p. 391-395, Feb. 1994.

COELHO, Y.S.; OLIVEIRA, A.A.R.; CALDAS, R.C. Efeitos do ácido giberélico (AG₃) no crescimento de porta-enxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.11, p. 1229-1232, nov. 1983.

CORDEIRO, J.A.D. **Crescimento, diferenciação e produção em plantas de sorgo granífero *Sorghum bicolor* (L.) Moench, tratadas com os ácidos giberélico-3 e α -naftalenoacético**. 1979. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

DEMATTEIS, M.; DAVIÑA, J.R. Chromosome studies on some orchids from South America. **Selbyana**, Sarasota, v.20, n.2, p.235-238, 1999.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. 1 ed. Portland:Dioscorides Press, 1993. v.1, 314p.

FAM, L.Y.; THAMEA, A.; WING,Y.T. Influence of the increase of ploidy levels (from 2n to 4n) on the physical attributes of *Ionocidium* popcorn. **Singapore Botanic Garden**: Singapore, 2003. Disponível em: <http://staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp-2003/sci-paper/botanic/research>. Acesso em: 12 set. 2004.

FARIA, R.T.; ILLG, R.D. Orquídea: *Dendrobium nobile*. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. p.34-36.

FARINACI, J.S. **Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum Thouars (Orchidaceae)* de campos rupestres**. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FELIX, L.; GUERRA, M. Cytogenetic and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.957-978, Dec. 2000.

FELIX, L.P. **Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero *Habenaria Willd.*** 2001. 214p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, 50, n.292, p.719-726, nov./dez. 2003.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.47, n.1, p. 73-77, 1996.

GRIESBACH, R.J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.76, n.1, p.74-75, Jan./Feb. 1985.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 142p.

GUSTAFSSON, A. Reproduction mode and crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.38, n.1, p. 109-117, 1968.

HASHIMOTO, K. Karyomorphological studies of some 80 taxa of *Dendrobium*, Orchidaceae. **Bulletim Hiroshima Botanical Garden**, Hiroshima, v.9, n.1, p. 01-186, 1987.

HAVAS, L. Effects of colchicine and “vascum album” preparations on germination of seeds and growth of seedlings. **Nature**, London, v.139, n.3513, p. 371-372, 1937.

JONES, K. The chromosomes of orchids, I. *Polystachya*. **Kew Bulletin**, London, v.20, n.1, p. 357-359, 1966.

JONES, S.B. IOPB Chromosome number reports LXXIV. **Taxon**, Utrecht, v.31, n.2, p. 126-127, 1982.

JONES, W.E.; KUEHNLE, A.R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, New York, v.82, n.2, p. 189-194, Aug. 1998.

KARASSAWA, K.; HASHIMOTO, K. Cytogenetics studies in the hybrids of *Dendrobium moniliforme*. **Bulletim Hiroshima Botanical Garden**, Hiroshima, v.3, n.1, p. 69-74, 1980.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D. Efeitos de giberelinas, citocininas e do nitrato de potássio no crescimento e desenvolvimento do porta-enxerto de limoeiro 'Cravo'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, n.2-3, p. 261-266, maio/dez. 1996.

LLERAS, E.; MEDRI, M.E. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do híbrido *Hevea brasiliensis* X *benthiana*. **Acta Amazonica**, Manaus, v.8, n.4, p. 565-575, dez. 1978.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 ed. Nova Odessa-SP: Plantarum, 2001. v.1, 1088p.

LÖVE, A.; MEHRA, P.N.; VIJ, S.P. IOPB Chromosome number reports. **Taxon**, Utrecht, v.19. n.1, P. 106, Feb, 1970.

MAGALLANES, M.G.R.; PINTO, C.A.B.P.; DAVIDE, L.C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.4, p. 480-484, out./dez., 1996.

MEDRI, M.E.; LLERAS, E. Comparação anatômica entre folhas de um clone diplóides (IAN 873) e dois clones e poliplóides (IAC 207, 222) de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. **Acta Amazonica**, Manaus, v.11, n.1, p. 35-47, mar. 1981.

MEHLQUIST, G.A.L. Some smear techniques for counting chromosomes in orchids. **Missouri Botanical Garden Bulletin**, Saint Louis, v.35, n.3, p. 229-233, 1947

MEHRA, P.N.; KASHYAP, S.K. **Cytology of orchids of North-West Himalayas**. Pramodh P. Kapur at Raj: New Delhi, 1989. 56p.

MENINI NETO, L.; ALMEIDA, V.R.; FORZZA, R.C. A família Orchidaceae na Reserva Biológica da Represa do Gama –Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.55, n.84, p. 137-156, 2004.

MERGEN, F.; LESTER, D.T. Colchicine induced polyploidy in *Abies*. **Forest Science**, Washington, v.7, n.4, p.314-319, Dec. 1971.

MONDIN, M. **Treinamento pré-profissional em citogenética vegetal**: desenvolvimento de técnicas para o estudo dos cromossomos da família Orchidaceae, treinamento em técnicas de bandeamento cromossômico e de cortes histológicos. 1998. 47p. Monografia (Residência Agrônoma) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MOREJOHN, L.C.; BUREAU, T.E.; TOCCHI, L.P.; FOSKET, D.E. Resistance of *Rosa microtubile* polymerization to colchicine results from a low-affinity interaction of colchicine and tubulina. **Planta**, Berlin, v.170, n.2, p.230-241, Feb. 1987.

MULLER, J.A.; YOUNG, M.J. Influence of gibberellic acid and effectiveness of several carriers on growth of sour orange (*Citrus aurantium* L.) seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v.17, n.4, p. 673-674, Aug. 1982.

PEHU, E.; VEILLEUX, R.; HILU, K.W.. Cluster analysis of anther-derived plants of *Solanum phyreja* (Solanaceae) based on morphological characteristics. **American Journal of Botany**, Columbus, v.74, n.1, p. 47-52, Jan. 1987.

PIRES, E.P.J. Emprego de reguladores de crescimento em viticultura tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.40-43, jul. 1998.

QIN, X.; ROTINO, G.L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.41, n.2, p.145-149, May 1995.

ROTH, P.S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake**. 1984. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SANGUTHAI, O.; SANGUTHAI, S.; KAMEMOTO, H. Chromosome doubling of *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristeme culture. **Na Pua Okika O Hawaii Nei**, Hawaii, v.2, n.1, p. 12-16, 1973.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.82, n.3-4, p. 265-277, Dec. 1999.

SCHWARZACHER, L.; AMBROS, P.; SHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 134, n.3-4, p. 293-297, 1980.

SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Amsterdam: Harwood Academic, 1999. 371p.

SHEEHAN, T.J. Recent advances in botany, propagation and physiology of orchids. **Horticultural Reviews**, New York, v.5, n.1, p. 279-315, 1983.

SHINDO, K.; KAMEMOTO, H. chromosome numbers and genome relationships in some species in the *Nigrohirsutae* section of *Dendrobium*. **Cytologia**, Tokyo, v. 28, n. 1, p. 68-75, 1963.

SLUDER, G. The practical use of colchicine and cocemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: ADOLPH, K.W. **Advanced techniques in chromosome research**. New York: Marcel Decker, 1991. p.427-447.

SIDAHMED, O.A. Effects of different levels of gibberellic acid (GA₃) on growth of sour orange (*Citrus aurantium*). **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.84, n.1, p. 165-169, Jan. 1978.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACKES, S.; ZANETTINI, M.H.B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lind. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p. 105-111, jan.-fev. 2000.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p. 516-520, jul.-set. 2004.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison Wesley, 1971. 215p.

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

TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.65, n.4, p. 305-312, Aug. 1996.

TAN, G.Y.; DUNN, G.M. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. **Crop Science**, Madison, v.13, n.3, p. 332-337, May/June 1973.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Ed. Cornell University Press, 1980. p. 329-397.

TOSCANO, L. A. B.; MORAES, M. M. **Saiba mais sobre orquídeas**. [on line] Disponível na Internet via <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>. Arquivo capturado em 01/09/2002

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K.V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v.83, n.2, p. 117-122, 1995.

VICHIATO, M.; VICHIATO, M.R.M.; CASTRO, D.M.; PASQUAL, M. Desenvolvimento vegetativo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) com fertilização organo-mineral em diferentes substratos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 4, 2004, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004a. p.394.

VICHIATO, M.R.M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D.M.; PASQUAL, M. Bucha vegetal e palito de xaxim no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) com fertilização organo-mineral. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 4, 2004b, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004. p.395.

VILLA, V.B. **Análise citomorfoanatômica e eletroforética de híbridos de *Solanum tuberosum* L. X (*Solanum tuberosum* L. X *Solanum chacoense* Bitt)**. 1995.76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VOSA, C. G. The ecology of B-chromosomes in *Listera ovata* (L.) R. BR. (*Orchidaceae*). **Caryologia**, Florence, v.36, n.1, p. 113-120, 1983.

WALTROUS, S.B.; WIMBER, D.E. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. **Lyndleyana**, New York, v.3, n.2, p. 177-183, 1988.

WAN, Y.; PETOLINO, J.F.; WIDHOLM, J.M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.77, n.1, p. 889-892, 1989.

WILFRET, G.J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). II. Karyotype relationships. **Cytologia**, Tokyo, v. 36, n. 1, p. 604-613, 1971.

WILFRET, G.J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium*. I. Cross compatibility. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 56, n. 1, p. 521-526, Jan. 1969.

WILFRET, G.J.; TAKESHITA, T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in *Dendrobium* (Orchidaceae). III. Meiotic behavior. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, n. 1, p. 43-46, Jan. 1979.

CAPÍTULO 2

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. In: _____. **Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. 2005. Cap. 2, p. 24-44. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras ¹

1 Resumo

A indução da duplicação cromossômica em orquídeas é uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético, pois geralmente promove aumento no tamanho da flor, a intensificação da cor e perfume, bem como a restauração da fertilidade de híbridos raros. Este trabalho objetivou a indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. Para a poliploidização, plantas com altura média de 5,0 cm foram completamente imersas, no escuro, em solução de colchicina a 0,05% e 0,1% por 24, 48, 72 e 96 horas. Sete meses após o início do tratamento, foram avaliados a taxa de sobrevivência, a altura e o diâmetro do pseudobulbo, o comprimento e a largura das folhas e os níveis de ploidia. A determinação do nível de ploidia foi feita por meio da contagem do número de cromossomos em células metafásicas. Verificou-se que o tratamento com colchicina, até um período máximo de imersão de 96 horas, não afetou a sobrevivência das plantas tratadas em relação à testemunha. Tetraplóides induzidos ($2n = 4x = 76$ cromossomos) foram obtidos após imersão das plantas por 72 e 96 horas, nas duas concentrações de colchicina testadas. A imersão das plantas de *D. nobile* em solução de colchicina a 0,1% por 96 horas induziu maior número de plantas tetraplóides (29,17%). Plantas mixoplóides não foram observadas.

¹ Comitê orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA (orientador), Prof. Dr. Daniel Melo de Castro-UFLA e Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

2 Abstract

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Polyploidy inductions and identification in *Dendrobium nobile* Lindl. In: _____. **Tetraploids induction and elongation of *Dendrobium nobile* Lindl. Plants (Orchidaceae)**. 2005. Cap. 2, p. 24-44. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Lavras Federal University, Lavras ¹

The induction of the chromosomal duplication is an important tool in plant breeding programs, since it usually promotes the increase of flower size, color and essence enhancement, as well as the restoration of the rare hybrids fertility. This research aimed at the induction and polyploidy identification in *Dendrobium nobile* Lindl. For the poliploidy induction, plants with medium height of 5.0 cm were completely submerged, in the darkness conditions, in 0,05% and 0,1% colchicine solutions for 24, 48, 72 and 96. Seven months later, they were evaluated the survival rate, the height and diameter of the pseudobulb and the ploidia levels. The ploidy level determination was made through the chromosomes counting in the metaphase cells. It was verified that the colchicina treatment, until a maximum period of immersion of 96 hours, did not affect the survival of the treated plants regarding the control. The induced tetraploids plants ($2n = 4x = 76$ chromosomes) were obtained after 72 and 96 hours of immersion periods at the colchicine concentrations tested. The immersion of *D. Nobile* plants on the 0,1% colchicine over 96 hours induced more tetraploids plants. Mixoploids plants not being observed.

¹ Guidance committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Daniel Melo de Castro – UFLA and Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro.

3 Introdução

Dendrobium nobile Lindl. (olho de boneca) é uma das orquidáceas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso. São citados mais de quinze cultivares, nas quais varia o tamanho e a cor das flores (Campos, 2000).

O considerável interesse pelo gênero *Dendrobium* é devido a sua larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats, cultivo relativamente simples e, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos e volume expressivo de comercialização (Jones et al., 1998).

A poliploidia nas plantas ocasiona, geralmente, um aumento em tamanho das estruturas vegetativas, o que é chamado por alguns autores de “gigantismo”. Por isso, a poliploidia beneficiou a orquicultura, uma vez que o aumento da variabilidade genética resultou em flores de maior valor comercial, normalmente de maior tamanho, com conformação mais redonda e maior conteúdo de substâncias que resultam na intensificação da cor e fragrância, quando comparadas com as orquídeas diplóides. Também é uma ferramenta útil na restauração da fertilidade de híbridos com problemas de pareamento dos cromossomos durante a meiose (Griesbach, 1985; Brieger, 1992; Dressler, 1993; Gao et al., 1996; Toscano e Moraes, 2002; Kim e Kim, 2003; Fam et al., 2003). Por essas características vantajosas, os melhoristas selecionam e realizam cruzamentos entre plantas poliplóides. Assim sendo, a análise citogenética de orquídeas é uma importante e imprescindível ferramenta em programas de melhoramento genético.

Entretanto, o efeito “gigas”, aumento das estruturas vegetativas, nem sempre é observado entre plantas com diferentes níveis de ploidia. Silva et al. (2000) observaram que todas as plantas de *Cattleya intermedia* tratadas com colchicina, indiferente do número de cromossomos, apresentaram crescimento

vigoroso e maior intensidade de coloração das folhas quando comparadas com as plantas testemunhas.

Esse fenômeno pode ser explicado pelo trabalho de Webster e Davidson (1969) que observaram que a duração do ciclo mitótico em raízes de *Vicia faba* pode ser influenciada pela ação da colchicina, que parece ter efeito similar as citocininas. Segundo Ruiz e Vasquez (1982), a colchicina adicionada ao meio de cultura modifica a relação auxina/citocinina, aumentando a população de células.

Farinaci (2001), que avaliou indivíduos diplóides e tetraplóides naturais de *Bulbophyllum ipanemense*, não observou qualquer modificação morfológica visualmente associada a poliploidia, nem mesmo o aumento no tamanho dos indivíduos.

Em trabalhos de poliploidização em orquídeas, a colchicina é a substância mais empregada e os meristemas são os materiais biológicos comumente utilizados. Porém essa metodologia é inadequada para a duplicação cromossômica de várias plantas por proporcionar elevada mortalidade, conseqüente da toxicidade da colchicina e do pequeno tamanho do explante que não permite um pegamento eficiente (Sanguthai et al., 1973; Griebach, 1985; Waltrous e Wimber, 1988; Silva et al., 2000; Kim e Kim, 2003; Fam et al., 2003; Barbosa, 2004). Por isso, a variação do material botânico a ser utilizado, bem como a variação da concentração e do tempo de exposição e as formas de aplicação da droga, tornam-se requisitos indispensáveis em programa de melhoramento genético, visando a duplicação cromossômica.

Pouco ainda se sabe a respeito da cariomorfologia das espécies desta família, que é a maior do reino vegetal (Tanaka e Kamemoto, 1980; Vosa, 1983). Schwarzacher et al. (1980) estimaram que, das 35.000 espécies existentes de orquídeas, somente 5% foram analisadas citogeneticamente.

O pequeno volume de informação deve-se à dificuldade de obtenção de preparações citológicas de boa qualidade, que permitam o espalhamento e a diferenciação linear dos cromossomos, possibilitando a identificação de centrômeros, das constrições secundárias e dos satélites. Isso é devido ao fato que, em orquídeas, geralmente é difícil interromper a formação do fuso mitótico por meio dos pré-tratamentos comuns. Algum progresso foi feito, nos últimos anos, pela introdução dos métodos de esmagamento e maceração dos tecidos com enzimas que degradam a parede celular. Apesar da inevitável desvantagem do alto número de cromossomos de tamanho muito pequeno, a citologia das orquídeas tem grande potencial nos estudos de afinidades taxonômicas, relações evolucionárias e em programas de melhoramento genético (Tanaka e Kamemoto, 1980; Dematteis e Daviña, 1999; Farinaci, 2001).

Embora os primeiros registros sobre o número cromossômico das espécies de *Dendrobium* datem de 1929, atualmente há pouca informação citogenética publicada para esse gênero, que normalmente apresenta números de cromossomos uniformes de $2n=2x=38$ (Shindo e Kamemoto, 1963; Wilfret e Kamemoto, 1969, 1971; Wilfret et al., 1979; Mehra e Kashyap, 1989; Index, 1994; Jones et al., 1998). Cromossomos B foram descritos para poucas espécies desse gênero (Löve et al., 1970; Mehra e Kashyap, 1989).

Considerando que a poliploidia nas plantas pode resultar em flores de maior valor comercial e que o gênero *Dendrobium* é muito popular no Brasil, esse trabalho objetivou a indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl.

4 Material e Métodos

4.1. Local

A pesquisa foi conduzida em casa-de-vegetação pertencente ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras, Minas Gerais, no período de janeiro de 2003 a março de 2004.

4.2 Material genético

As plantas de *D. nobile* diplóides ($2n = 38$ cromossomos), com altura média de 5,0 cm e 3 folhas foram obtidas de um orquidário particular em Lavras-MG. A confirmação do nível de ploidia, via análise citogenética, foi feita de acordo com Vichiato et al. (2004).

4.3 Poliploidização

Plantas de *D. nobile* diplóides ($2n = 38$ cromossomos) tiveram as raízes aparadas para permanecerem com 1,0-1,5 cm de comprimento.

Em dois recipientes com capacidade para 5 litros, as plantas foram totalmente imersas em solução aquosa de colchicina a 0,05% e 0,1% por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. O tratamento testemunha constou de 24 plantas não imersas em solução de colchicina. Durante o período de imersão, as plantas permaneceram no escuro, a temperatura ambiente. Objetivando prevenir danos às plantas por depleção de oxigênio, utilizou-se borbulhamento de ar constante, por meio de bombas aeradoras de aquário doméstico. Para aumentar a eficiência da colchicina foi adicionado Tween-80 a 0,01% (Roth, 1984).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 24 repetições, com uma planta por parcela, perfazendo um total de 216 parcelas, sendo 192 tratadas com colchicina.

Depois de transcorrido cada tempo de tratamento com colchicina, as plantas foram lavadas cuidadosamente em água corrente por 20 minutos e em água destilada por 5 minutos, para remover o excesso de colchicina. Em seguida, foram devidamente identificadas e plantadas em vasos de polietileno preto com volume de 500 cm³, contendo fibra de xaxim como substrato.

As plantas foram transferidas para a casa de vegetação, sobre bancadas metálicas, onde permaneceram por sete meses. A irrigação foi feita de acordo com as condições de umidade do substrato sendo, em média, quatro vezes por semana. Dois meses após os tratamentos de poliploidização, efetuou-se adubação básica semanal com o fertilizante Biofert Plus[®] na concentração de 5,0 mL L⁻¹ por meio de pulverização foliar (Araújo, 2004). Foi feita a aplicação de 2mL da solução por planta.

4.4 Análise citogenética

A determinação do nível de ploidia foi realizada através da contagem de cromossomos, sete meses após o início do experimento. Para isso, ápices de 1 cm de 5 raízes por planta de *D. nobile* foram pré-tratados em água gelada, com temperatura próxima a 0°C, por 24 horas.

Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em solução recém-preparada de ácido acético: clorofórmio: etanol 95% (1:3:6) a 4°C por 24 horas e transferidas para álcool 70%, onde permaneceram armazenadas a 4°C, em refrigerador.

Posteriormente, o material foi submetido à técnica de esmagamento convencional, sendo as raízes lavadas, por três vezes, em água deionizada por um período de 10 minutos. A hidrólise da parede celular foi feita utilizando-se

HCl 1N por 30 a 40 minutos, dependendo da espessura da raiz, em banho -maria a 60°C. Após essa etapa, as raízes foram imersas em água deionizada gelada por 1 minuto para interrupção da reação de hidrólise e, posteriormente, submetidas a água deionizada a temperatura ambiente.

A extração e fragmentação do meristema foram feitas sob microscópio estereoscópio e a montagem da lâmina por esmagamento em ácido acético 45%. A coloração foi feita com solução de Giemsa a 3% com tampão fosfato pH 6,8 por 10 minutos e a fixação da lâmina foi feita com Entellan[®].

A observação e análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio Olympus BX 60, sob iluminação de campo claro, usando objetiva de aumento de 100 vezes (imersão em óleo).

A análise do efeito dos diferentes tratamentos na poliploidização de *D. nobile* foi feita em pelo menos três lâminas por tratamento, levando em conta o acúmulo de metáfases, o espalhamento e a morfologia dos cromossomos. Foram avaliadas, em média, 50 metáfases por lâmina.

4.5 Avaliações e análises estatísticas

Sete meses após o início do experimento, avaliaram-se as seguintes características: taxa de sobrevivência, altura do pseudobulbo (medida com régua e expressa em cm), o diâmetro do pseudobulbo (medido com paquímetro digital e expresso em mm), a largura e o comprimento da folha (medido com paquímetro digital e expresso em cm) e o nível de ploidia (obtido pela contagem do número de cromossomos em células metafásicas). Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott Knott a 1% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000). Para a variável número de poliplóides foram ajustadas equações de regressão polinomial em função das doses de colchicina e

dos tempos de imersão, utilizando dados transformados para $\sqrt{x+1}$, utilizando nível de significância de 5% de probabilidade para o teste F.

5 Resultados e Discussão

5.1 Sobrevivência das plantas de *Dendrobium nobile*

A metodologia testada nesse trabalho promoveu 100% de sobrevivência nas plantas de *D. nobile* em todos os tratamentos. Concordando com Roth (1984), em termos de sobrevivência, esse resultado é satisfatório em comparação a outros métodos de poliploidização *in vitro* conhecidos, envolvendo a aplicação de colchicina e descritos na literatura (Sanguthai et al., 1973; Griebach, 1985; Waltrous e Wimber, 1988; Silva et al., 2000; Kim e Kim, 2003; Fam et al., 2003). Isso é importante porque a baixa sobrevivência das plantas, em consequência da toxidez da colchicina, é um dos obstáculos para os fitomelhoristas (Roth, 1984; Wan et al., 1989; Abreu, 2002; Kim e Kim, 2003).

A ausência de morte em plantas de *D. nobile* tratadas com colchicina, sugere que essa orquídea possui maior resistência aos efeitos nocivos do alcalóide. Silva et al. (2000) observaram que, para o mesmo tratamento, clones de variedades diferentes de *Cattleya intermedia* apresentavam diferentes respostas para a taxa de mortalidade, indicando um possível efeito do genótipo na resistência à colchicina. Comportamentos semelhantes foram observados em clones CO₁, DO₁ e BO₁ de *Eucalyptus urophylla* (Roth, 1984).

5.2 Características das plantas duplicadas

As plantas diplóides deste trabalho apresentaram, até o sétimo mês após o início do tratamento com colchicina, maior altura (125,81%), maior diâmetro do pseudobulbo (96,44%), com folhas 73,18% maiores e 50% mais largas quando comparadas com as folhas tetraplóides (Figura 1, Tabela 1). As plantas

poliplóides de *D. nobile* também expressaram desenvolvimento lento e pouco vigoroso com raízes reduzidas, mas com folhas de coloração e textura normais (Figura 1).



FIGURA 1- Plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. sete meses após tratadas com colchicina: A: diplóide (38 cromossomos); B: tetraplóide induzido (76 cromossomos). Barra = 10 cm. UFLA, Lavras-MG, 2005.

TABELA 1- Altura da planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), comprimento (CF) e largura da folha (LF) em plantas diplóides e tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005.

Nível de ploidia	AP (cm)	DP (mm)	CF (cm)	LF (cm)
Diplóide	11,2 a	6,07 a	9,30 a	2,4 a
Tetraplóide	4,96 b	3,09 b	5,37 b	1,6 b
CV(%)	22,72	22,31	8,2	6,4

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott a 1% de probabilidade.

Esse comportamento também foi observado por Vandenhout et al. (1995) e Gao et al. (1996). O efeito “gigas”, aumento das estruturas vegetativas,

encontra-se comumente em órgãos de padrão de crescimento altamente determinado como flores e sementes (Roth, 1984; Dressler, 1993) e, por isso, nem sempre é observado entre plantas com diferentes níveis de ploidia. Assim sendo, em trabalhos com duplicação cromossômica, o crescimento mais vigoroso das plantas não pode ser classificado como indicador morfológico de poliploidia.

As características das plantas poliplóides de *D. nobile* são, provavelmente, conseqüentes da dosagem gênica dobrada. O efeito morfofisiológico imediato da poliploidização é o aumento do tamanho das células devido ao maior volume nuclear. Conseqüentemente, gasta-se mais tempo e energia na duplicação do próprio DNA (Dressler, 1993), e isso conduz a uma redução do número de divisões celulares durante o desenvolvimento, causando retardamento no ciclo mitótico e nos ciclos vitais, que expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo (Roth, 1984; Griesbach, 1985; Brieger, 1992; Dressler, 1993; Takamura e Miyajima, 1996; Toscano e Moraes, 2002).

5.3 Metodologia e análise citogenética

A água gelada por 24 horas, utilizada como pré-tratamento para não afetar os resultados dos tratamentos com colchicina, favoreceu o acúmulo de metáfases no tecido meristemático de raízes de *D. nobile* e forneceu cromossomos com muitas aderências, bastante condensados e, portanto, de tamanho muito reduzido (Figura 2), características também observadas por Lim e Jones (1982), Mondin (1998), Felix (2001) e Farinaci (2001). Isso dificultou a visualização precisa do centrômero, impossibilitando a utilização mais extensiva da morfologia cromossômica como parâmetro citológico.

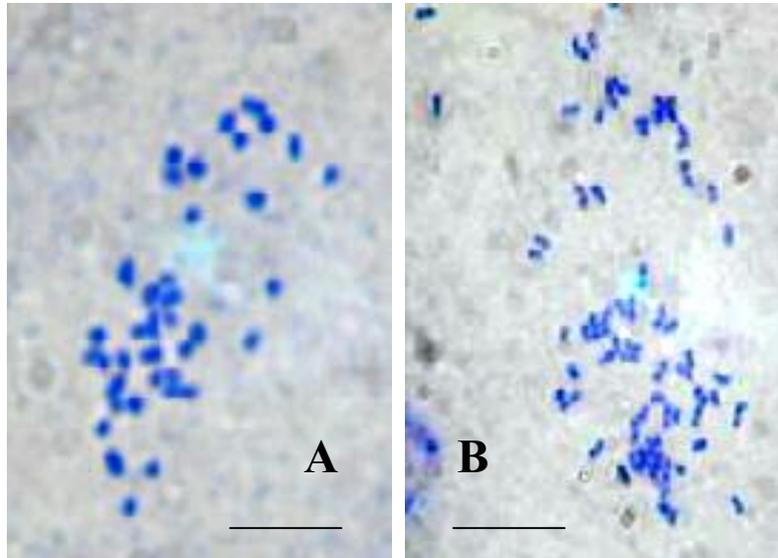


FIGURA 2 -Metáfases mitóticas de *Dendrobium nobile* Lindl.: A) diplóide (38 cromossomos); B) tetraplóide induzido (76 cromossomos). UFLA, Lavras-MG, 2005. Barra = 5 µm.

A água gelada promoveu nos ápices radiculares os mesmos efeitos de outras substâncias despolimerizadoras das fibras do fuso, como a colchicina, a ciclohexamida e 8-hidroxiquinoleína, concordando com Östergren (1944), Mondin (1998) e Silva et al. (2000).

A dificuldade de bloquear o fuso mitótico através dos pré-tratamentos comuns, provavelmente pela morfologia das raízes epífitas, e o pequeno tamanho dos cromossomos das orquídeas prejudicaram a obtenção de um bom espalhamento das células, o que também foi observado por Lim e Jones (1982), Silva et al. (2000), Felix (2001) e Farinaci (2001). Mesmo assim, foi possível determinar o número cromossômico de *D. nobile*. As plantas testemunhas e não poliploidizadas de *D. nobile* apresentaram $2n = 38$ cromossomos e as plantas poliploides eram tetraploides induzidos, com $2n = 76$ cromossomos (Figura 2).

Apesar da pouca informação citogenética publicada para essa espécie, esse resultado é condizente com a literatura que mostra que *D. nobile* apresenta números de cromossomos uniformes de $2n=2x=38$ (Jones, 1982; Karassawa e Hashimoto, 1980).

Nesse trabalho também foi observado que raízes de *D. nobile* respondem diferentemente ao tipo de fixador usado. Quando as raízes foram fixadas em solução recém-preparada de Carnoy – metanol (ou etanol): ácido acético (P.A.) na proporção de 3:1, onde permaneceram por 24 horas, observou-se que, apesar dos tecidos apresentarem células com um grande número de divisões, poucas foram as metáfases de qualidade. Os cromossomos dessas células apresentaram grande aglomeração, o que inviabilizou a contagem dos mesmos. Resultados positivos foram observados quando as raízes de *D. nobile* foram fixadas em solução recém-preparada de ácido acético: clorofórmio: etanol 95% (1:3:6). Esse fixador também foi usado com sucesso em raízes de *Cattleya intermedia* (Silva et al., 2000).

Segundo Mondin (1998) e Dietrich (1986), a morfologia dos cromossomos metafásicos também pode ser alterada pela fixação, sendo que pouca atenção tem sido dada a essa etapa da metodologia. Dietrich (1986) demonstrou que, em cromossomos humanos, o formaldeído promoveu o aparecimento de cromossomos alongados com material fino distribuído ao seu redor. A morfologia assemelhou-se a da configuração do corpo protéico e a distribuição do DNA pela eliminação das histonas. Em plantas, pouco foi descrito sobre o efeito da fixação sobre a morfologia dos cromossomos.

5.4 Análise do número de tetraplóides induzidos

Observou-se interação significativa do tempo de tratamento com a concentração de colchicina (Tabela 2).

TABELA 2 - Resumo da análise de variância do número de tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl. em duas concentrações colchicina e 5 períodos de imersão. UFLA, Lavras –MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM
Tratamento	8	0,2289 **
Tempo (T)	3	0,4574 **
% Colchicina (C)	1	0,1507 **
T X C	3	0,0563 **
Fatorial X Adicional	1	1,5291 **
Resíduo	27	0,0139
TOTAL	35	
C.V. (%)		10,03%

**Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

A duplicação cromossômica em plantas de *D. nobile* somente foi possível nos tratamentos por 72 e 96h, nas duas concentrações de colchicina testadas (Tabela 3). Tempos maiores de exposição em solução de colchicina também favoreceram a obtenção de poliplóides em híbridos de *Dendrobium* cultivados *in vitro* (Sanguthai et al., 1973), *Phalaenopsis* (Griesbach, 1981) e *Cattleya intermedia* (Silva et al., 2000).

TABELA 3- Percentagem de plantas tetraplóides induzidas obtidas com tratamento de *Dendrobium nobile* Lindl. com duas concentrações colchicina e 4 tempos de imersão. UFLA, Lavras –MG, 2005.

Colchicina (%)	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
0,1	0,0 a	0,0 a	12,5% a	29,17% a
0,05	0,0 a	0,0 a	8,33% b	16,67% b

*Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Desdobrando-se a interação tempo em cada nível de colchicina, foram observados efeitos dos tempos de tratamento a partir de 72 h, nas duas concentrações testadas (Figura 3), obtendo-se maior média de plantas tetraplóides com solução de colchicina a 0,1%.

Assim, fica evidente que a concentração de colchicina e o tempo de imersão foram diretamente proporcionais à frequência de tetraplóides induzidos em *D. nobile*, nas condições deste experimento. Isso sugere que, em experimentos semelhantes, doses mais altas de colchicina e/ou intervalos de tempos maiores possibilitam maior percentagem de poliplóides. Griesbach (1981) obteve 50% de *Phalaenopsis* tetraplóides utilizando colchicina a 0,05% por 10 a 14 dias. Em *Cattleya intermedia*, a maior média de plantas poliplóides foi obtida com solução de colchicina a 0,1% por 8 dias (Silva et al., 2000)

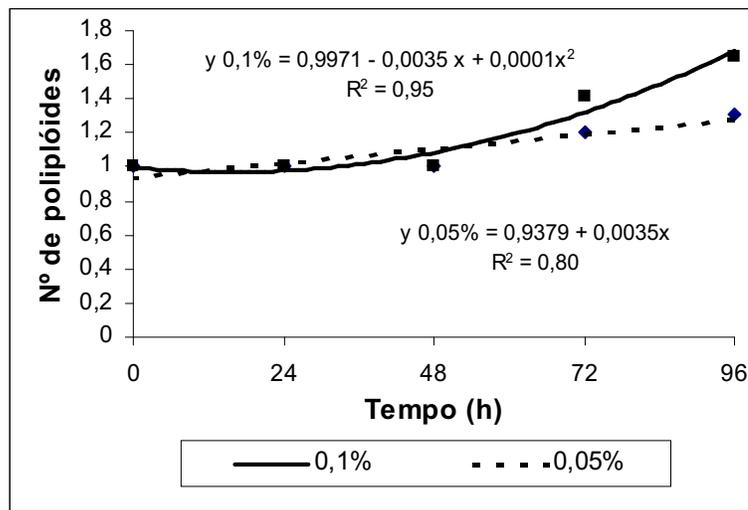


FIGURA 3 - Número médio de plantas poliplóides obtidas com tratamento de *Dendrobium nobile* Lindl. com duas concentrações colchicina por 5 períodos de tempo. UFLA, Lavras – MG, 2005. (Dados transformados para $\sqrt{x+1}$).

Das 192 plantas de *D. nobile* tratadas com colchicina, 16 (8,33%) eram tetraplóides. Sanguthai et al. (1973) observaram que 40% das plantas de *Dendrobium* que sobreviveram aos efeitos da colchicina eram poliplóides. Silva et al. (2000), que cultivaram protocormos de dois clones de *Cattleya intermedia*, conseguiram, das plantas sobreviventes, 13% e 36% de tetraplóides. Esses resultados sugerem que a solução de colchicina adicionada ao meio de cultura de meristema é mais eficiente na indução de poliploidia em orquídeas do que a imersão das plantas intactas. Barbosa (2004) realizou a indução de poliploidia em híbridos de capim-elefante e milho cultivo *in vitro* e *in vivo* e observou que o cultivo *in vitro* facilitou tanto a indução de duplicação cromossômica quanto a obtenção e proliferação de raízes.

Mixoplóides, muito comuns em trabalhos de poliploidização, não foram encontrados. Esse fato pode ser explicado pelo maior intervalo de tempo entre o dia do tratamento à avaliação citogenética, que foi de 210 dias. Silva et al. (2000), que, avaliaram dois clones de *Cattleya intermedia* aos 120 dias após os tratamentos, detectaram 9% e 13% de plantas mixoplóides. Apesar de não existirem dados exatos quanto ao tempo necessário para a avaliação do nível de ploidia, sabe-se que a planta tratada com colchicina está apta para ser avaliada quando sofreu inúmeras divisões celulares, apresentando raízes, folhas e pseudobulbo novos e desenvolvidos. Obviamente, esse período de tempo varia entre as espécies e, como o desenvolvimento das orquídeas é muito lento, exige maior intervalo de tempo.

6 Conclusões

A indução de poliploidia em *Dendrobium nobile* Lindl., mediante imersão das plantas em solução de colchicina é satisfatória, obtendo maior número de indivíduos poliplóides (29,17%) na concentração 0,1% por 96 horas.

A imersão em solução de colchicina a 0,05% e 0,1%, até um período máximo de 96 horas, não afeta a sobrevivência das plantas até os sete meses após o tratamento.

7 Referências Bibliográficas

ABREU, J.C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante X milho tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 71p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas**. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho**. 2004. 119p. Tese (Doutorado Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRIEGER, A.H.N. **Caracterização morfológica e estudo da anatomia foliar de populações de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae)**. 1992. 79p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAMPOS, K.O. **Floração em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) e os níveis endógenos de citocininas, auxina e ácido abscísico**. 2000. 74p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DEMATTEIS, M.; DAVIÑA, J.R. Chromosome studies on some orchids from South America. **Selbyana**, New York, v.20, n.1, p.235-238, 1999.

DIETRICH, A.J.J. The influence of fixation on the morphology of mitotic chromosomes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.28, n.2, p.536-539, Abr. 1986.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. 1 ed. Portland:Dioscorides Press, 1993. v.1, 314p.

FAM, L.Y.; THAMEA, A.; WING,Y.T. Influence of the increase of ploidy levels (from 2n to 4n) on the physical attributes of *Ionocidium* popcorn. **Singapore Botanic Garden**: Singapore, 2003. Disponível em: <http://staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp-2003/sci-paper/botanic/research..> Acesso em: 12 set. 2004.

FARINACI, J.S. **Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum Thouars (Orchidaceae)* de campos rupestres**. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FELIX, L.P. **Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero *Habenaria Willd.*** 2001. 214p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.1, p.73-77, Feb.1996.

GRIESBACH, R.J. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.76, n.1, p.74-75, Jan./Feb. 1985.

INDEX to plant chromosome numbers 1990-1991. Saint Louis, M.O.: **Missouri Botanical Garden**, 1994. 267p.

JONES, S.B. IN: IOPB Chromosome number reports LXXIV. **Taxon**, Utrecht, v.31, n.2, p.126-127, 1982.

JONES, W.E.; KUEHNLE, A.R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, New York, v.82, n.2, p.189-194, Aug. 1998.

KARASSAWA, K.; HASHIMOTO, K. Cytogenetics studies in the hybrids of *Dendrobium moniliforme*. **Bulletim Hiroshima Botanical Garden**, Hiroshima, v.3, n.1, p.69-74, 1980.

KIM, M.S.; KIM, J.Y. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. **Proceedings of NIOC**, Nagoya, p.37-40, 2003. Disponível em: <<http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC2003/poster/37-40>>.

LIM, K.Y.; JONES, K. The chromosomes of Orchids VI: *Bulbophyllum*. **Kew Bulletin**, London, v.37, n.2, p.217-219, 1982.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 ed. Nova Odessa-SP: Plantarum, 2001. v.1, 1088p.

LÖVE, A.; MEHRA, P.N.; VIJ, S.P. IOPB Chromosome number reports. **Taxon**, Utrecht, v.19. n.1, p.106, Feb, 1970.

MEHRA, P.N.; KASHYAP, S.K. **Cytology of orchids of North-West Himalayas**. Pramodh P. Kapur at Raj: New Delhi, 1989. 56p.

MONDIN, M. **Treinamento pré-profissional em citogenética vegetal**: desenvolvimento de técnicas para o estudo dos cromossomos da família Orchidaceae, treinamento em técnicas de bandeamento cromossômico e de cortes histológicos. 1998. 47p. Monografia (Residência Agrônoma) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ÖSTERGREN, G. Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. **Hereditas**, Landskrona, v.30, n.1, p.429-467, 1944.

ROTH, P.S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake**. 1984. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

RUIZ, M.L.; VÁSQUEZ, A.M. Colchicine effect on the chromosome number of barley embryos cultured *in vitro*. **Protoplasma**, Vienna, v.113, n.3, p.237-240, 1982.

SANGUTHAI, O.; SANGUTHAI, S.; KAMEMOTO, H. Chromosome doubling of *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristeme culture. **Na Pua Okika O Hawaii Nei**, Hawaii, v.2, n.1, p.12-16, 1973.

SCHWARZACHER, L.; AMBROS, P.; SHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v.134, n.3-4, p.293-297, 1980.

SHINDO, K.; KAMEMOTO, H. chromosome numbers and genome relationships in some species in the *Nigrohirsutae* section of *Dendrobium*. **Cytologia**, Tokyo, v. 28, n.1, p.68-75, 1963.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACKES, S.; ZANETTINI, M.H.B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lind. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.105-111, jan.-fev. 2000.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: ARDITTI, J. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives III**. Ed. Cornell University Press, 1980. p.329-397.

TOSCANO, L. A. B.; MORAES, M. M. **Saiba mais sobre orquídeas**. [on line] Disponível na Internet via <http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>. Arquivo capturado em 01/09/2002

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K.V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v.83, n.2, p.117-122, 1995.

VICHIATO, M.R.M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D.M.; DAVIDE, L.C. Indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUADOS DA UFLA, 13, 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p.248-254.

VOSA, C. G. The ecology of B-chromosomes in *Listera ovata* (L.) R. BR. (Orchidaceae). **Caryologia**, Florence, v.36, n.1, p.113-120, 1983.

WALTROUS, S.B.; WIMBER, D.E. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. **Lyndleyana**, New York, v.3, n.2, p.177-183, 1988.

WAN, Y.; PETOLINO, J.F.; WIDHOLM, J.M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.77, n.1, p.889-892, 1989.

WEBSTER, P.L.; DAVIDSON, D. Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and indol-3yl-acetic in *Vicia faba* roots. **The Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.20, n.64, p.671-685, Jan. 1969.

WILFRET, G.J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). II. Karyotype relationships. **Cytologia**, Tokyo, v. 36, n.1, p.604-613, 1971.

WILFRET, G.J.; T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium*. I. Cross compatibility. **American Journal of Botany**, Columbus, v.56, n.1, p.521-526, 1969.

WILFRET, G.J.; TAKESHITA, T.; KAMEMOTO, H. Genome and karyotype relationships in *Dendrobium* (Orchidaceae). III. Meiotic behavior. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, n.1, p.43-46, Jan. 1979.

CAPÍTULO 3

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Análises estomática e de crescimento em plantas diplóides e tetraplóides induzidos de *Dendrobium nobile* Lindl. In: _____. **Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. 2005. Cap.3, p. 45-65. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras ¹

1 Resumo

Este trabalho objetivou comparar plantas diplóides ($2n=2x=38$) e tetraplóides induzidas ($2n=4x=76$) de *Dendrobium nobile* Lindl., mediante análises estomáticas e de crescimento. Para a análise estomática em microscopia de luz, foram coletadas folhas completamente expandidas do 3º nó, fixadas em FAA₅₀ e submetidas aos procedimentos usuais em microtécnica vegetal. Os cortes paradermicos foram corados com safranina 1%. Foram avaliados a frequência estomática, a frequência das outras células epidérmicas, o índice estomático, os diâmetros polar e equatorial dos estômatos e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial. Para a descrição dos estômatos em microscopia eletrônica de varredura, as folhas, nas mesmas condições descritas para a microscopia de luz, foram cortadas em segmentos de 2cm x 2cm, fixadas em solução aquosa de Karnovsk, pós-fixadas com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% e desidratadas até o ponto crítico. Posteriormente, o material aderido a blocos especiais (“stubs”) e recoberto com ouro metálico, sendo em seguida observado ao microscópio eletrônico de varredura. Para a análise de crescimento nas plantas utilizadas nas análises estomáticas, foram avaliados a altura e o diâmetro do pseudobulbo e a largura e comprimento das folhas. *D. nobile* apresentou estômatos elípticos, com laterais gradualmente inclinadas, sendo o tamanho dos estômatos inversamente proporcional ao nível de ploidia. As plantas tetraplóides induzidas apresentaram menor crescimento que as diplóides. Portanto, em *D. nobile* foi possível distinguir plantas diplóides das plantas tetraplóides induzidas utilizando a análise estomática e de crescimento.

¹ Comitê orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA (orientador), Prof. Dr. Daniel Melo de Castro-UFLA e Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro -UFLA.

2 Abstract

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Stomatal and growth analysis in diploids and induced tetraploids plants of *Dendrobium nobile* Lindl.. In: **Tetraploids induction and prolongation of plants of *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. 2005. Cap. 3, p. 45-65. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras ¹

This work aimed to compare diploid ($2n=2x=38$) and induced tetraploids ($2n=4x=76$) plants of *Dendrobium nobile* Lindl through stomatal and growth analysis. For the stomatal analysis in light microscopy, completely expanded leaves of the third knot were collected, fixed in FAA₅₀ and submitted to the usual procedures in plant microtechnique. The paradermic sections were staining in 1% safranin. They were evaluated the stomatal frequency, the number of the epidermal cells other ones, the stomatal index, the polar and equatorial diameters of the stomata and the polar and the equatorial diameter relationship. For the stomatal analysis through scanning electron microscopy, leaves in the same conditions described for the light microscopy were cut in 2 x 2 cm segments, fixed in Karnovisk solution, pos-fixed with 1% osmium tetroxide aqueous solution, and dehydrated until the critical point. Further, the material was stuck to special blocks ("stubs") and covered with a metallic gold layer being observed soon after to the scanning electron microscopy. For the growth analysis in the plants used in the stomatal analysis, they were evaluated the height and the diameter of the pseudobulb and the width and length of the leaves. The *D. nobile* plants presented elliptic stomata with lateral gradually tilted, being the stomatal size inversely proportional at the ploidy level. The induced tetraploids plants presented smaller growth than the diploid ones. Therefore, in the *D nobile* it was possible to discriminate diploid plants from the induced tetraploids plants using the stomatal and growth analysis.

¹ Guidance committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Daniel Melo de Castro – UFLA and Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

3 Introdução

Em experimentos de duplicação cromossômica, a determinação do nível de ploidia deve ser preferencialmente através da contagem de cromossomos, cujo método é laborioso e demorado, sendo desvantajoso quando se trata de análises em grande número de plantas.

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica, ou seja, a avaliação de determinadas características da planta, tais como aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, tamanho e densidade dos estômatos foliares. Esse método pode ser útil para inferir o nível de ploidia de plantas submetidas à indução de poliploidia, sendo a análise estomática a mais citada na literatura (Vandenhout et al., 1995; Magallanes et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004).

A análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação entre supostos poliplóides e as testemunhas diplóides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos, uma vez que o comprimento dos mesmos normalmente aumenta com o número de cromossomos.

No entanto, alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido aos efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Vandenhout et al., 1995; Magallanes et al., 1996; Duren et al., 1996; Sari et al., 1999; Souza e Queiroz, 2004). Como o crescimento e desenvolvimento de uma folha são comandados por vários meristemas, funcionando simultânea ou seqüencialmente, em

trabalhos de poliploidização é evidente a dificuldade em se fazer com que a colchicina, um duplicador do número de cromossomos, afete todos esses meristemas, localizados em diferentes pontos topográficos da gema e funcionando em momentos diferentes, mesmo considerando apenas uma gema isolada (Roth, 1984). Além disso, a folha é a estrutura de maior plasticidade do vegetal e a que mais se modifica em resposta às alterações ambientais (Morretes e Ferri, 1959; Lleras, 1977; Alves et al., 2001).

Heichel (1971) realizou cruzamentos entre duas linhagens de milho com frequência estomática diferentes e concluiu que, pelos padrões de segregação, as frequências estomáticas e das células epidérmicas estão sob controle de um mesmo sistema genético. Segundo esse autor, o controle genético da variação na frequência estomática possibilita a modificação da condutância da folha para controlar a perda de água, a absorção de gás carbônico e de poluentes gasosos nas folhas.

Motonobu et al. (1997) e Kim e Kim (2003) observaram que o número de estômatos em crisântemo e *Cymbidium*, respectivamente, foi diretamente proporcional ao nível de ploidia e que o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia.

A análise estomática em *D. nobile* também não é segura na identificação de diferentes níveis de ploidia, uma vez que a endopoliploidia é freqüente no gênero, explicando o porquê da alta percentagem de variação somaclonal em plantas micropropagadas por folhas (Jones e Kuehnle, 1998).

A endopoliploidia é o modo mais comum de poliploidização em plantas, podendo ser encontrada em muitos tipos de células, especialmente naquelas que estão sofrendo diferenciação e expansão (Larkins et al., 2001). Dessa forma, é possível que a endopoliploidia mantenha uma estreita relação entre tamanho da célula e tamanho do seu núcleo.

Jones e Kuehnle (1998), mediante citometria de fluxo em folhas de *D. nobile*, observaram que o conteúdo de DNA variou nas folhas maduras (2C, 4C, 8C e 16C) e jovens (2C, 4C e 8C), predominando 8C nas maduras e 2C nas folhas jovens. A endopoliploidia também foi observada em espécies do gênero *Vanda* (Lim e Loh, 2003), *Spathoglottis* (Raghaven e Goh, 1994) e *Cymbidium* (Nagl, 1972).

Alguns autores sugerem que a freqüência da endopoliploidia varia de acordo com os níveis de auxina, citocinina, ácido abscísico e giberélico (Meyers et al., 1990; Artlip et al., 1995; Valente et al., 1998). Há evidência que estes reguladores de crescimento afetam diretamente a expressão de genes fundamentais que regulam o ciclo celular (Frank e Schmölling, 1999).

Auras (1997) observou que o tamanho, o índice estomático e a densidade estomática variaram em função dos efeitos do ácido giberélico e do retardante paclobutrazol (PBZ) em girassol. Os resultados foram relacionados com variações ontogenéticas, sugerindo que a giberelina tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas. No girassol sob efeitos de PBZ, as folhas não se expandiram até o tamanho original e a área foliar foi reduzida, apresentando maiores índices estomáticos adaxiais e abaxiais, devido ao aumento no número de estômatos por unidade de área.

Auras (1997) também sugere que a giberelina desempenha algum papel no crescimento das células-guarda, uma vez que o comprimento dessas nas superfícies abaxial e adaxial foi reduzido com a aplicação do retardante. Segundo Raven et al. (2001), o ácido giberélico causa alongamento das células da folha pelo aumento da plasticidade da parede celular, levando a um aumento na captação de água e, assim, aumentando a pressão de turgescência.

Fosket (1994) afirma que a formação de células-guarda ocorre somente no final do desenvolvimento foliar e que está relacionada com o número de divisões celulares que ocorreram na protoderme, tecido meristemático primário

que origina a epiderme. Segundo Tichá (1982), existe um mecanismo regulador da produção de estômatos que parece ter como referência o tamanho foliar final e/ou o tempo necessário para atingi-lo. Portanto, o mecanismo regulador da diferenciação nas folhas pode ser bioquímica e fisiologicamente reprogramado e a produção de estômatos pode ser prolongada, durante o reajuste, ocasionando índices estomáticos mais altos (Auras, 1997).

Os estômatos de *D. nobile* estão localizados somente na superfície abaxial da folha (Vichiato et al., 2004a). Existem várias modificações no formato dos estômatos em orquídeas, incluindo elíptico, circular, transversalmente elíptico e angular. Em *Dendrobium* somente não foi encontrado o formato angular dos estômatos (Yukawa et al., 1992).

Segundo Yukawa et al. (1992), o gênero *Dendrobium* é um dos maiores da família Orchidaceae, sendo também um dos mais problemáticos a respeito da sua classificação intragenérica e suas relações com outros membros dessa família. Dentro deste gênero existem dois tipos estomáticos, que podem contribuir para a sua análise sistemática. O estômato classificado como tipo I apresenta abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas; o tipo II apresenta abertura estomática circular a fusiforme, com laterais íngremes.

Os estômatos de *Dendrobium* têm várias vantagens como marcadores taxonômicos: o tamanho e a forma são estáveis, tanto dentro do mesmo indivíduo como entre indivíduos da mesma espécie, quando comparados com o tamanho e formato de outras células epidérmicas; embora a preparação das lâminas afete freqüentemente as formas características da superfície estomática, nesse gênero observou-se somente a contração dos estômatos (Yukawa et al., 1992).

Este trabalho objetivou comparar plantas diplóides ($2n=2x=38$) e tetraplóides induzidos ($2n=4x=76$) de *Dendrobium nobile* Lindl., mediante análises estomáticas e de crescimento.

4 Material e Métodos

4.1 Microscopia de luz

Este trabalho foi realizado no laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras-UFLA, no período de setembro a dezembro de 2004.

As plantas de *D. nobile* diplóides ($2n=2x=38$) e tetraplóides ($2n=4x=76$), já identificadas quanto ao nível de ploidia, via análise citogenética (Vichiato et al., 2004b), foram obtidas no Departamento de Agricultura da UFLA, sete meses após o início do tratamento com colchicina.

Foram utilizadas folhas de plantas diplóides com comprimento médio de 9,3 cm e 2,4 cm de largura e folhas tetraplóides com 5,37 cm de comprimento e 1,6 cm de largura.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 16 repetições, com uma planta por parcela, perfazendo um total de 32 parcelas.

Para o estudo de cada nível de ploidia, foi selecionada 1 folha completamente expandida por planta, retirada do 3º nó. As folhas foram fixadas em FAA₅₀ por 72 horas e conservadas em álcool 70%.

Foram realizados cortes paradérmicos abaxiais à mão livre na região mediana central das folhas, que foram submetidos a técnicas usuais em anatomia vegetal e, posteriormente, corados com safranina 1%.

Para cada lâmina foram avaliados, aleatoriamente, 10 campos e 10 medidas de estômatos por planta, conforme sugerido por Speckmann et al. (1965). Foram avaliados a frequência de estômatos, a frequência das células epidérmicas, os diâmetros polar e equatorial dos estômatos, o índice estomático e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial dos estômatos.

As frequências estomáticas e das outras células epidérmicas foram calculadas pela contagem do número de estômatos por área do campo

equivalente a 0,0676 mm² de área da folha. Posteriormente, as frequências estomáticas e das outras células epidérmicas foram determinados por mm².

O índice estomático foi calculado pela seguinte expressão proposta por Salisbury (1927), citado por Lea et al. (1977): $I = S / (E + S) \times 100$; onde I representa o valor do índice estomático, S representa o número de estômatos por unidade de área da folha e E representa o número de células epidérmicas na mesma área.

Todos os dados anatômicos foram obtidos com auxílio de microscópio de luz Olympus. As medições foram feitas com auxílio de lâmina micrometrada e câmara clara.

Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas através do teste Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

As imagens foram registradas através de fotomicrografias, obtidas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX60.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Microscopia da Universidade Federal de Lavras-UFLA, no período de dezembro de 2004 a fevereiro de 2005.

As folhas, nas mesmas condições descritas para a microscopia de luz, foram cortadas em segmentos de 2cm de largura e altura máxima de 2cm.

Os espécimes foram fixados em solução aquosa de Karnovsk, pH 7,2 por 24 horas e, logo após, lavou-se o material, por três vezes, em solução tampão cacodilato 0,1 M por um período de 10 minutos.

Em capela a temperatura ambiente, o material foi pós-fixado com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,1 M, por 1 hora. Após esse período, lavou-se o material, por três vezes, em água destilada

por um período de 10 minutos e realizou-se a desidratação com série de acetona crescente (acetona 25, 50, 75, 90 e 100%), por três vezes cada, por um período de 10 minutos. Em seguida, o material foi levado ao equipamento de ponto crítico para completar a secagem com CO₂.

Os cortes foram aderidos a blocos especiais para microscopia eletrônica de varredura (“stubs”) e recobertos com uma camada de ouro metálico de, aproximadamente, 10 nm de espessura.

As imagens foram registradas através de eletromicrografias, utilizando-se microscópio eletrônico de varredura JEOL T200. Foi avaliado o tipo estomático de *D. nobile*, conforme Yukawa et al. (1992).

4.3 Crescimento de plantas de *D. nobile*

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 16 repetições com uma planta por parcela, perfazendo um total de 32 parcelas.

Nas plantas diplóides e tetraplóides de *D. nobile*, utilizadas nas análises estomáticas, foram avaliadas as seguintes características: altura do pseudobulbo (medida com régua e expressa em cm), diâmetro do pseudobulbo (medido com paquímetro digital e expresso em mm), largura e comprimento das folhas (medido com paquímetro digital e expresso em cm). As medições foram realizadas ao final do experimento, em fevereiro de 2005.

Para cada planta foram selecionadas 3 folhas completamente expandidas, localizadas entre o 2^o e o 4^o nó.

Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas através do teste Skott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

5 Resultados e Discussão

O estudo comparativo das características estomáticas entre as plantas diplóides e tetraplóides induzidos de *D. nobile* mostrou diferenças significativas ($P < 0,01$), conforme Tabela 1.

TABELA 1 – Frequência de estômatos (FE), frequência de células epidérmicas (FCE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DE), relação entre diâmetro polar e o diâmetro equatorial (DP/DE) e índice estomático (IE) nas folhas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras–MG, 2005.

Nível de ploidia	FE (mm ²)	FCE (mm ²)	DP (µm)	DE (µm)	DP/DE	IE (%)
Diplóide	831,51 b	5890,08 b	44,08 a	36,08 a	1,228 a	12,33 a
Tetraplóide	992,01 a	7212,99 a	39,05 b	33,08 b	1,188 a	11,75 a
C.V. (%)	14,25	15,28	5,59	7,30	4,70	7,28

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott a 5% de probabilidade.

5.1 Frequência e diâmetro dos estômatos

Como pode ser observado na Tabela 1, houve diferença significativa entre a frequência estomática em folhas de *D. nobile* diplóides e tetraplóides.

Nas folhas de plantas tetraplóides ocorreu aumento na frequência dos estômatos (19,30%) e na frequência das outras células epidérmicas (22,46%) por unidade de área (Tabela 1). Esses resultados estão relacionados ao menor tamanho das células epidérmicas nas plantas tetraplóides, quando comparadas com as diplóides, concordando com Heichel (1971), que observou que as

freqüências estomáticas e das outras células epidérmicas estão sob controle de um mesmo sistema genético.

O diâmetro dos estômatos apresentou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os dois níveis de ploidia testados. Em folhas de plantas tetraplóides ocorreu diminuição no diâmetro polar (11,6%) e equatorial (8,8%) dos estômatos em relação às plantas diplóides (Tabela 1). Conforme diversos autores, o aumento no nível de ploidia é diretamente proporcional ao tamanho dos estômatos, mas de acordo com Duren et al. (1996), Magallanes et al. (1996), Duren et al. (1996), Motonobu et al. (1997), Sari et al. (1999), Kim e Kim (2003) e Souza e Queiroz (2004) a avaliação indireta do nível de ploidia, como a análise estomática, pode não corresponder a essa hipótese, uma vez que os fatores ambientais também estão envolvidos.

Assim sendo, as folhas de plantas tetraplóides de *D. nobile* apresentam maior freqüência estomática porque o tamanho de suas células epidérmicas é menor em relação às plantas diplóides, o que pode ser observado na Figura 1.

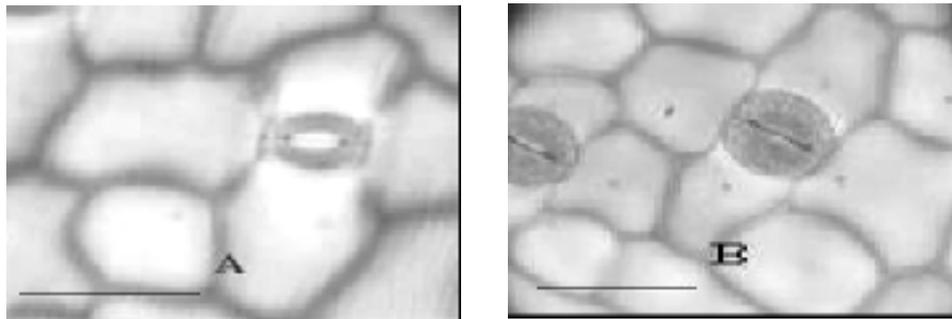


FIGURA 1 – Fotomicrografia de epiderme da face abaxial de folha diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005. Barra = 30 μ m.

Esses resultados concordam parcialmente com Motonobu et al. (1997), que também observaram que o número de estômatos em folhas de crisântemo foi diretamente proporcional ao aumento dos cromossomos, mas o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia.

Kim e Kim (2003), que utilizaram colchicina para duplicação cromossômica *in vitro* em *Cymbidium* sp. (Orchidaceae), chegaram às mesmas conclusões que Motonobu et al. (1997), isso é, o número de estômatos aumentou com os crescentes níveis de ploidia, porém não houve variação no tamanho dos mesmos. No entanto, nenhuma hipótese relacionada ao tamanho e frequência dos estômatos nos diferentes níveis de ploidia foi sugerida pelos autores.

Nas folhas de plantas diplóides de *D. nobile* houve redução de 19,3% na frequência estomática por mm² e diminuição de 22,46% na frequência das outras células epidérmicas por mm². Esses resultados concordam com o trabalho de Lea et al. (1977), que concluíram que o tamanho da célula epidérmica era o principal fator determinante da frequência estomática.

5.2 Relação DP/DE e características dos estômatos

Conforme a Tabela 1, não houve diferença significativa entre a relação DP/DE entre os estômatos de folhas de *D. nobile* diplóides (1,228) e tetraplóides (1,188).

Esses resultados concordam com Yukawa et al. (1992), que observaram que os estômatos do gênero *Dendrobium* apresentam tamanho e forma estáveis tanto dentro do mesmo indivíduo como entre indivíduos da mesma espécie, quando comparados com o tamanho e formato de outras células epidérmicas.

Por essas características, os estômatos de *D. nobile* podem ser vantajosos como marcadores taxonômicos. Segundo a classificação estomática de Yukawa et al. (1992), o estômato de *D. nobile* foi classificado como do tipo I,

por apresentar abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas (Figura 2).

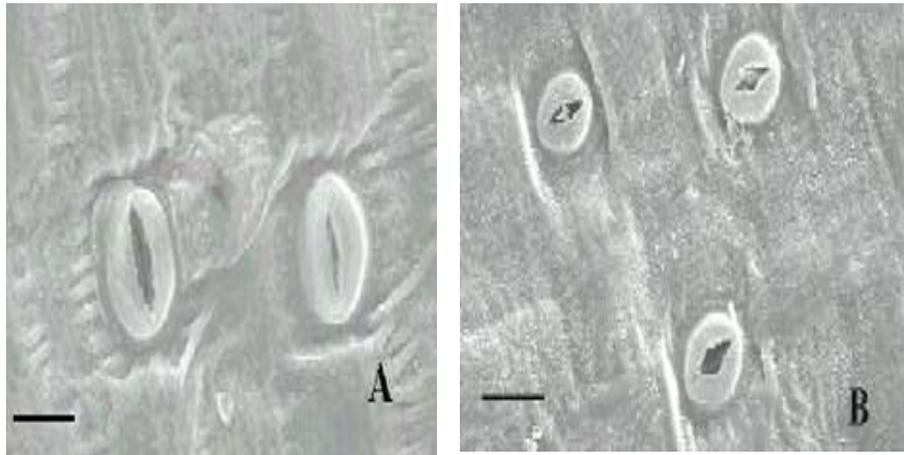


FIGURA 2 – Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005. Barra = 20 μ m.

5.3 Índice estomático

Como pode ser observado na Tabela 1, não houve diferença significativa entre o índice estomático de folhas de *D. nobile* diplóides (12,33%) e tetraplóides (11,75%).

Lea et al. (1977) também observaram que o índice estomático não variou em três níveis de ploidia da forrageira *Bromus inermis*, concluindo que o tamanho da célula epidérmica era o principal fator determinante da frequência estomática. Assim, a baixa frequência de estômatos nas folhas diplóides de *D. nobile* pode estar relacionada com o maior tamanho dos estômatos (Tabela 1) e,

aparentemente, também com o maior tamanho das outras células epidérmicas (Figura 1).

Considerando que as folhas das plantas diplóides e tetraplóides estavam completamente expandidas, esses resultados concordam com Tichá (1982), que observou que, dentro de uma espécie, quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha. Assim sendo, a seleção de folhas completamente expandidas para análise estomática é importante porque, a diferenciação dos meristemóides precursores das células-guarda e das demais células epidérmicas, prossegue até que a folha alcance de 10 a 50% de seu tamanho final, quando a maior parte das células epidérmicas já completou sua atividade mitótica. (Tichá, 1982; Yang e Sack, 1995).

5.4. Crescimento das plantas de *D. nobile*

As folhas das plantas diplóides de *D. nobile* foram 73,18% maiores e 50% mais largas, quando comparadas com as folhas tetraplóides (Tabela 2). Segundo Auras (1997), a giberelina tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas.

TABELA 2 – Comprimento (CF) e largura da folha (LF), altura da planta (AP) e diâmetro do pseudobulbo (DP) em plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras–MG, 2005.

Nível de ploidia	CF (cm)	LF (cm)	AP (cm)	DP (mm)
Diplóide	9,30 a	2,4 a	11,2 a	6,07 a
Tetraplóide	5,37 b	1,6 b	4,96 b	3,09 b
C.V. (%)	8,2	6,4	22,72	3,09

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott a 5% de probabilidade.

Como somente as plantas poliplóides sofreram efeitos da colchicina (as diplóides eram plantas testemunhas), sugere-se que esse alcalóide tenha afetado negativamente a biossíntese das giberelinas, originando plantas com folhas pequenas (Tabela 2), células-guarda e epidérmicas de menor tamanho (Figura 1, Tabela 1).

Os pseudobulbos das plantas diplóides de *D. nobile* eram mais altos (125,80%) e com maior diâmetro (96,44%) quando comparados com os pseudobulbos das plantas tetraplóides (Tabela 2).

Além da redução no comprimento e na largura das folhas e na altura e diâmetro dos pseudobulbos, as plantas tetraplóides de *D. nobile* também expressaram desenvolvimento lento e pouco vigoroso e apresentaram raízes reduzidas, porém a coloração das plantas era normal quando comparadas com as plantas diplóides. Estas características são, provavelmente, conseqüentes da dosagem gênica dobrada, exigindo maior gasto energético durante a divisão celular, causando retardamento no ciclo mitótico, que expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo (Takamura e Miyajima, 1996).

Apesar da colchicina ser mutagênica e muito eficiente para produzir modificações fenotípicas (Conagin, 1972), a hipótese de que esse alcalóide induziu mutação nas plantas poliplóides foi totalmente descartada, uma vez que 100% das plantas apresentaram as mesmas características.

5.5 Relação entre folhas poliplóides de *D. nobile* e ecofisiologia

As características observadas nas folhas tetraplóides de *D. nobile* como: células menores (Figura 1, Tabela 1), menor tamanho da folha (Tabela 2) e maior número de estômatos por unidade de área (Tabela 1) são comumente relacionadas com xerofilia (Bonates, 1993).

Uma vez que as trocas gasosas, nas folhas, ocorrem principalmente através dos estômatos, o aumento na freqüência estomática associado à redução

no tamanho das folhas das plantas tetraplóides, pode ser um mecanismo importante de adaptação a condições mais áridas, já que a frequência de estômatos está associada à condutância estomática e com menor área foliar. Dessa maneira, a folha tetraplóide de *D. nobile* teria menor exposição ao sol, diminuindo sua temperatura interna. Segundo Heichel (1971), o controle genético na variação da frequência estomática possibilita a modificação da condutância da folha para controlar a perda de água, a absorção de gás carbônico e de poluentes gasosos nas folhas.

Considerando que *D. nobile* é uma epífita que ocupa nichos úmidos e poucos ensolarados e que suas folhas não apresentam características acentuadamente xeromorfas (Vichiato et al., 2004a), as características observadas nas folhas tetraplóides teriam importante papel na adaptação da planta em condições ambientais com menor disponibilidade de água.

Essa hipótese concorda com o trabalho de Lleras (1977), no qual afirma que quanto mais xerofíticas as condições, menor o tamanho e maior a frequência estomática por unidade de área. Dessa maneira é permitida uma troca de gases mais eficientes nos períodos em que a umidade relativa é alta, quando o risco de desidratação excessiva é mínimo.

Assim sendo, a poliploidia em orquídeas pode ser vantajosa, por aumentar a possibilidade de adaptação de suas plantas, caso surjam variações bruscas no ambiente (Briggs e Walters, 1984; Soltis e Soltis, 1999; Farinaci, 2001).

6 Conclusões

A frequência dos estômatos e das outras células epidérmicas, o tamanho dos estômatos, o diâmetro e tamanho dos pseudobulbos, o comprimento e a largura das folhas são eficientes na distinção entre plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl.

O tamanho dos estômatos de *D. nobile* é inversamente proporcional ao nível de ploidia.

As plantas tetraplóides de *D. nobile*, com 7 meses após a indução de poliploidia, têm menor crescimento que as diplóides.

Os estômatos de *D. nobile* são do tipo I, com abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas.

7 Referências Bibliográficas

ALVES, E.S.; GIUSTI, P.M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P.H.N.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p.561-566, dec. dez. 2001.

ARTLIP, T.S.; MADISON, J.T.; SETTER, T.L. Water deficit in developing endosperm of maize: cell division and nuclear DNA endoreduplication. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 18, n.4, p.1034–1040, Abr. 1995.

AURAS, N.E. **Efeitos do paclobutrazol sobre morfologia e anatomia foliar, crescimento de parte aérea, distribuição de biomassa e trocas gasosas em girassol**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BONATES, L.C.M. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia. II - Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma capina da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 23, n.4, p.315-348, dez. 1993.

BRIGGS, D.; WALTERS, S.M. **Plant variation and evolution**. Cambridge University Press, Cambridge, 1984. 282p.

CONAGIN, C.H.T.M. Efeitos da colquicina em *Arachis hypogaea* L. **Bragantia**, Campinas, v.31, n.15, p.187-198, 1972.

DUREN, M.V.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. **Euphytica**, Wagenigen, v.88, n.1, p.25-34, Jan. 1996.

FARINACI, J.S. **Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae) de campos rupestres**. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.

FRANK, M.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin cycles cells. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v.4, n.1, p.243–244, Jan. 1999.

HEICHEL, G.H. Genetic control of epidermal cell and stomatal frequency in maize. **Crop Science**, Madison, v.11, n.6, p.830-832, Nov./Dec. 1971.

JONES, W.E.; KUEHNLE, A.D. Ploidy identification using flow cytometry in tissues of *Dendrobium* species and cultivars. **Lindleyana**, New York, v.13, n.1, p.11-18, Jan. 1998.

KIM, M.S.; KIM, J.Y. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. **Proceedings of NIOC**, Nagoya, p.37-40, 2003. Disponível em: <<http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC2003poster/37-40>>.

LARKINS, B.A.; DILKES, B.P.; DANTE, R.A.; COELHO, M.C.; WOO, Y.M.; LIU, Y. Investigating the how and whys of DNA endoreduplication. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.355, p.183-192, Feb. 2001.

LEA, H.Z.; DUNN, G.M.; KOCH, D.W. Stomatal indexes in three ploidy levels of *Bromus inermis* Leys. **Crop Science**, Madison, v.17, n.4, p.669-670, July/Aug. 1977.

LIM, W.L.; LOH, C.S. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). **New Phytologist**, London, v.159, n.1, p.279-287, Jan. 2003.

LLERAS, E. Differences in stomatal number per unit area within the same species under different micro-environmental conditions: a working hypothesis. **Acta Amazonica**, Manaus, v.7, n.4, p.473-476, dez. 1977.

MAGALLANES, M.G.R.; PINTO, C.A.B.P.; DAVIDE, L.C. Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.4, p. 480-484, out./dez., 1996.

MEYERS, P.N.; SETTER, T.L.; MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. Abscisic acid inhibition of endosperm cell division in cultured maize kernels. **Plant Physiology**, Oxford, v.94, n.3, p.1330-1336. Sep.1990.

MORRETES, B.L.; FERRI, M.G. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado. **Boletim da faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP**, São Paulo, v.16, p. 7-70, 1959.

MOTONOBU, E., J.S. KIM, I. INADA. Production and characteristics of chromosome doubled plants of small flowered garden Chrysanthemum, *Dendranthema × grandiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. **Journal Japan Society Horticulturae Science**, Tokyo, v.65, n.4, p.528-833. Dec. 1997.

NAGL, W. Evidence of DNA amplification in orchid *Cymbidium in vitro*. **Cytobios**, Cambridge, v.5, n.1, p.145-154, 1972.

RAGHAVEN, V.; GOH, C.J. DNA synthesis accumulation during germination of embryos of the orchid *Spathoglottis plicata*. **Protoplasma**, Vienna, v.183, n.1-4, p.137-147, 1994.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

ROTH, P.S. **Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake.** 1984. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SARI, N.; ABAK, K.; PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.82, n.3-4, p.265-277, Dec. 1999.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.14, n.9, p.348-352, 1999.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.516-520, jul.-set. 2004.

SPECKMANN, G.J.; POST JR, J.; DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. **Euphytica**, Wageningen, v.14, n.1, p.35-42, Feb. 1965.

TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.65, n.4, p.305-312, Aug. 1996.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 7. Stomata density and sizes. **Photosynthetica**, Praha, v.16, n.1, p.375-471, Feb. 1982.

VALENTE, P.; TAO, W.; VERBELEN, J.P. Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and reduplication in single cells of tobacco. **Plant Science**, Limerick, v.134, n.1, p.207-215, May 1998.

VANDENHOUT, H.; ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R.; BAI, K.V. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. **Euphytica**, Wagenigen, v.83, n.2, p.117-122, Jun. 1995.

VICHIATO, M.R.M.; CASTRO, D.M.; VICHIATO, M.; GONÇALVES, S.V.B.; LIMA, M.P. Anatomia foliar de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: Congresso Nacional de Botânica, 55, 2004, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004a. p. 28.

VICHIATO, M.R.M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D.M.; DAVIDE, L.C. Indução e identificação de poliplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13, 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004b. p.248-254.

YANG, M.; SACK, F.D. The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.2, p.2227-2239, Feb.1995.

YUKAWA, T.; ANDO, T.; KARASAWA, K.; HASHIMOTO, K. Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance. **American Journal of Botany**, Columbus, v.79, n.8, p. 946-952, Aug. 1992.

CAPÍTULO 4

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. In: _____. **Indução de tetraplóides e alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)**. 2005. Cap. 4, p. 66-78. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras¹

1 Resumo

Dendrobium nobile Lindl. (olho de boneca) é uma das orquídeas mais populares do Brasil, ocupando posição de destaque no mercado de plantas de corte e de vaso. Entretanto, o desenvolvimento muito lento da família Orchidaceae tem contribuído para o elevado valor unitário de suas plantas, sendo necessárias técnicas que promovam a obtenção mais rápida de plantas comercializáveis. Objetivando avaliar o efeito do ácido giberélico no alongamento de plantas de *D. nobile*, foi realizado experimento em delineamento inteiramente casualizado com cinco concentrações de GA₃ (0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) e treze repetições. Foram feitas quatro pulverizações quinzenalmente e noventa dias após a primeira pulverização, avaliaram-se as seguintes características: altura e diâmetro do pseudobulbo, número de folhas, largura e comprimento das folhas. A aplicação do GA₃ promoveu, em comparação às plantas testemunhas, incrementos de 64,08% em altura e 44,27% no comprimento das folhas e decréscimos de 50% no diâmetro do pseudobulbo e 56,09% na largura das folhas. Não houve diferença entre as concentrações de GA₃ testadas. Portanto, o ácido giberélico nas concentrações de 50 a 400 mg.L⁻¹ é igualmente eficiente no alongamento de plantas *D. nobile*.

¹ Comitê orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA (orientador), Prof. Dr. Daniel Melo de Castro - UFLA e Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

2 Abstract

VICHIATO, Mívia Rosa de Medeiros. Elongation of *Dendrobium nobile* Lindl. plants by gibberellic acid pulverization. In: _____. **Tetraploids induction and elongation of *Dendrobium nobile* Lindl. plants (Orchidaceae)**. 2005. Cap. 4, p. 66-78. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Lavras Federal University, Lavras¹

Dendrobium nobile Lindl. (olho de boneca) it is one of the most popular orchids of Brazil, occupying prominence position in the market of cut plants and pot. However, the very slow development of the family Orchidaceae has been contributing to the high unitary value of your plants, being necessary techniques that promote the fastest obtaining of plants marketed. With objective of evaluating the effect of the gibberellic acid in the elongation of plants of *D. nobile* spread by cutting, an entirely randomized experimental design was carried out with five concentrations of GA₃ (0, 50, 100, 200 and 400 mg.L⁻¹) and thirteen replications. They were made four sprays biweekly in the whole plant, and ninety days after the first spraying, the following characteristics were evaluated: height and diameter of the pseudobulbs, number of leaves, width and length of the leaves. The GA₃ application promoted, in comparison with the control, increasings of 64,08% in height and 44,27% in the length of the leaves and decreasing of 50% in the diameter of the pseudobulbs and 56,09% in the width of the leaves. There was not difference among the GA₃ concentrations tested. Therefore, the giberelic acid in the concentrations from 50 to 400 mg.L⁻¹ is efficient to elongation of *D. nobile* plants.

¹ Guidance committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Daniel Melo de Castro – UFLA and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

3 Introdução

As orquídeas são consideradas as mais antigas espécies ornamentais, sendo cultivadas tanto para produção de plantas de corte como de vaso (Sheehan, 1983; Faria e Illg, 1998; Fráguas et al., 2003). No entanto, as plantas dessa família apresentam desenvolvimento muito lento, requerendo maior período de cultivo antes de serem comercializadas. Isso tem contribuído para o elevado valor unitário de suas plantas no mercado. Assim sendo, existe grande interesse na diminuição do tempo de formação da muda de orquídea, uma vez que isto acarretaria em diferentes benefícios e, principalmente, numa diminuição dos custos.

O gênero *Dendrobium* apresenta mais de 1000 espécies, sendo considerado um dos maiores da família Orchidaceae. O considerável interesse por esse gênero é devido à sua larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos (Jones et al., 1998).

A giberelina (GA₃) ou ácido giberélico é um hormônio que atua nas plantas como estimulante de crescimento, originando plantas de maior tamanho em consequência da sua ação na divisão e expansão celulares. Em muitas espécies, a dominância apical das plantas acentua-se após as aplicações com o ácido giberélico (Rossell, 1971; Cordeiro, 1979; Taiz e Zeiger, 1998).

O ácido giberélico é pouco solúvel em água e éter sulfúrico e apresenta boa solubilidade em soluções de bicarbonato e acetato de sódio (Rossell, 1971; Application..., 1996). Não pode ser dissolvido em águas alcalinas, nem misturado com outros produtos fitofarmacêuticos, uma vez que as soluções de ácido giberélico são pouco estáveis. Além disso, a aplicação dessa solução é inviável quando existe previsão de chuva nas seis horas após a aplicação e/ou

com temperaturas iguais ou superiores a 32°C. A pulverização com ácido giberélico somente é aconselhável em culturas com bom estado de desenvolvimento vegetativo e, por causa do maior desenvolvimento das plantas, há necessidade de adubação suplementar (Rossell, 1971; Application..., 1996).

Em orquídeas, a giberelina é comumente utilizada no meio de cultura visando estimular o desenvolvimento do embrião e também na indução do florescimento, mediante pulverização (Chen et al., 1994). Em plantas intactas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* sob 16 horas de luz, o GA₃ não promoveu aumento dos pseudobulbos (Suzuki et al., 2004). No entanto, a pulverização com giberelina ainda não foi utilizada para o alongamento das plantas intactas. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos da pulverização de GA₃ nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹ no alongamento de plantas de *D. nobile*.

4 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras–MG, no período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005.

Foram utilizadas plantas de *D. nobile* com 4 meses de idade, cultivadas em vasos de polietileno de 500 cm³, contendo como substrato fibra de coco. As plantas apresentavam, em média, três folhas, 4,74 cm de altura, peso de 2,85 g, um broto com 6,07 cm de altura e foram mantidas em casa de vegetação, sobre bancada metálica. A irrigação foi feita de acordo com as condições de umidade do substrato sendo, em média, quatro vezes por semana, durante todo o experimento.

Efetuar-se-ão quatro pulverizações, realizadas pela manhã a intervalos quinzenais (Coelho et al., 1983), com 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹ de GA₃. A

solução utilizada para a testemunha foi água e Tween-80 a 0,01%. As plantas foram intensamente molhadas com o tratamento, até ser atingido o ponto de escorrimento, conforme sugerido por Sidahmed (1978), Coelho et al. (1983) e Leonel e Rodrigues (1996). Para aumentar a eficiência do ácido giberélico, foi adicionado Tween-80 a 0,01% em todas as pulverizações (Menegucci et al., 2001).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 13 repetições com uma planta por parcela, perfazendo um total de 65 parcelas.

Quatro dias após a primeira pulverização com ácido giberélico, foi realizada a primeira adubação. As adubações foram aplicadas semanalmente, via foliar, durante todo o experimento, utilizando o fertilizante comercial Biofert® na concentração de 5,0 mL.L⁻¹, aplicando-se 2mL da solução por planta (Araújo, 2004).

Noventa dias após a primeira pulverização, avaliaram-se as seguintes características dos brotos: altura do pseudobulbo (medida com régua graduada em milímetros e expressa em cm), diâmetro do pseudobulbo (medido com paquímetro digital e expresso em mm), número de folhas (obtido pela contagem de todas as folhas do broto), largura e comprimento das folhas (medido com paquímetro digital e expresso em cm).

Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

5 Resultados e Discussão

Para todas as características avaliadas nas plantas de *D. nobile* tratadas com o fitorregulador, não houve diferença entre as concentrações de GA₃

(Tabela 1 e Figura 1). Entre as plantas testemunhas e as tratadas com GA₃, houve diferenças significativas (P< 0,01) na altura e diâmetro dos pseudobulbos e no comprimento e largura das folhas de *D. nobile* (Tabela 1 e Figura 1).

TABELA 1 – Altura (AP), diâmetro, (DP), número de folhas (NF) e número de entrenós do pseudobulbo (NE) e comprimento (CF) e largura da folha (LF) de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. tratadas com ácido giberélico. UFLA, Lavras –MG, 2005.

GA ₃ (mg.L ⁻¹)	AP (cm)	DP (mm)	NF	NE	CF (cm)	LF (cm)
0	8,38 b	7,00 a	4,07 a	6,15 a	5,33 b	1,92 a
50	13,69 a	4,15 b	4,46 a	6,46 a	7,38 a	1,53 b
100	13,75 a	3,91 b	4,83 a	6,75 a	7,07 a	1,38 b
200	12,17 a	3,50 b	3,83 a	6,08 a	7,23 a	1,23 b
400	13,53 a	3,92 b	4,00 a	6,69 a	7,69 a	1,23 b
C.V. (%)	16,80	27,31	22,66	13,37	12,36	30,83

* Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

O ácido giberélico promoveu crescimento do pseudobulbo de *D. nobile* (Tabela 1 e Figura 1). As plantas tratadas com o fitorregulador eram 64,08% mais altas (13,75 cm) quando comparadas com as plantas testemunhas, com altura média de 8,38 cm (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de Sidahmed (1978), Muller e Yong (1982), Coelho et al. (1983), Casper e Taylor (1989) e Leonel e Rodrigues (1996).

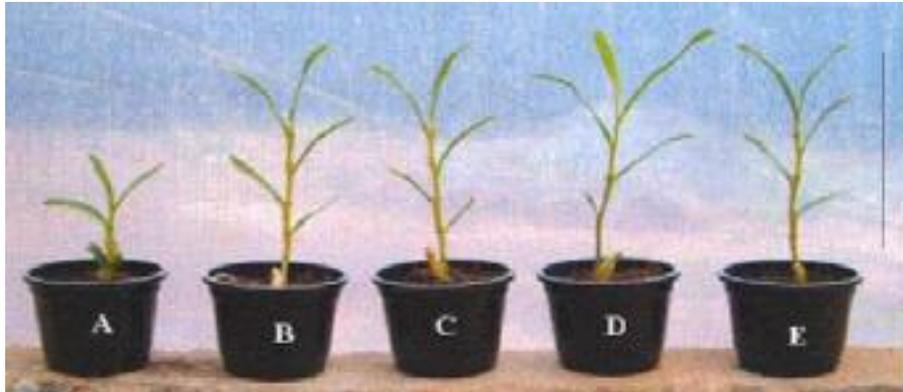


FIGURA 1- Desenvolvimento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. tratadas com ácido giberélico nas concentrações 0 (A), 50 mg.L⁻¹ (B), 100 mg.L⁻¹ (C), 200 mg.L⁻¹ (D) e 400 mg.L⁻¹ (E). UFLA, Lavras –MG, 2005. Barra = 10 cm.

A promoção de crescimento do pseudobulbo de *D. nobile* por GA₃ deveu-se à sua ação no alongamento celular que, conseqüentemente, afetou o tamanho das plantas, concordando com Almeida e Pereira (1996). Sachs et al. (1960) reportaram que a aplicação de giberelina em caules produz aumento na divisão celular do meristema apical, promovendo a formação de grande número de células e o alongamento individual de cada célula. A aplicação de GA₃ em caules também estimula o crescimento de tecidos jovens dos entrenós (Cordeiro, 1979).

A provável hipótese com relação ao mecanismo através do qual as giberelinas estimulam a expansão celular, é a hidrólise do amido. Elas podem gerar α -amilase que hidrolisa o amido envolvido no fornecimento de energia às células, incrementando a produção de açúcares e elevando a pressão osmótica do suco celular. Como resultado da diminuição do potencial osmótico, o fluxo de água ocorre mais rapidamente para o interior da célula favorecendo assim sua expansão (Cordeiro, 1979; Daykin et al. 1997; Pires, 1998). Além desses efeitos,

parece evidente também que as giberelinas aumentam a plasticidade da parede celular, controlando a ação de determinadas enzimas que podem regular o fluxo de água nas células durante a expansão (Salisbury e Ross, 1985; Huttly e Phillips, 1995; Daykin et al. 1997).

As plantas de *D. nobile* apresentavam, antes do tratamento, altura média de 6,07 cm. Noventa dias após o início dos tratamentos, houve incremento de 2,31 cm (38,05%) na altura das plantas testemunhas e de 7,68 cm (126,52%) nas plantas tratadas com ácido giberélico (Tabela 1).

Por esses resultados, afirma-se que plantas de *D. nobile* com 4 meses de idade e altura média 6,07 cm, propagadas vegetativamente por divisão do pseudobulbo, respondem favoravelmente ao tratamento com ácido giberélico. Segundo Trewavas (1981), a sensibilidade de um tecido vegetal a um hormônio depende da idade do mesmo e da presença da proteína receptora de hormônio, ou seja, da concentração do complexo proteína receptora da substância de crescimento. Assim, a presença ou ausência da sensibilidade ao fitoregulador seria reflexo da concentração da proteína receptora. Em girassol, quanto mais jovem for a planta, maior a sua sensibilidade ao ácido giberélico (Almeida e Pereira, 1996; Auras, 1997).

Um outro importante fator que pode ter contribuído para os efeitos positivos das giberelinas observados neste trabalho, foi a época em que o experimento foi instalado (11/11/2004). Para Meltivier (1986), o meio ambiente parece exercer efeito sobre a concentração de giberelinas. Segundo o autor, em condições de dias longos as plantas tendem a produzir mais giberelinas que em condições de dias curtos. Leonel e Rodrigues (1996), que iniciaram seus experimentos no outono, que apresenta dias curtos, não observaram efeitos positivos das giberelinas no aumento em altura do caule das plantas intactas de *Citrus limonia*.

Além da promoção de crescimento do pseudobulbo, as plantas de *D. nobile* tratadas com GA₃ apresentaram coloração verde clara, com folhas mais largas e pseudobulbo com diâmetro menor que o controle (Tabela 1), características também observadas por Almeida e Pereira (1996).

O diâmetro dos pseudobulbos das plantas testemunhas foi 50% maior quando comparadas com as plantas tratadas (Tabela 1). A pulverização com GA₃ diminuiu o diâmetro dos pseudobulbos de *D. nobile* provavelmente porque este é o principal órgão armazenador de água, carboidratos e nutrientes minerais das orquídeas epífitas (Zimmerman, 1990). Como as giberelinas agem sobre o metabolismo dos carboidratos, estocados principalmente no pseudobulbo, o diâmetro do pseudobulbo diminuiu por causa da hidrólise de suas substâncias de reserva. Além disso, o acúmulo de carboidratos no tecido eleva a pressão osmótica, fazendo com que o fluxo de água, estocada principalmente no pseudobulbo, ocorra mais rapidamente para o interior da célula, favorecendo a sua expansão (Cordeiro, 1979; Daykin et al. 1997; Pires, 1998).

O número de entrenós dos pseudobulbos não foi influenciado pela pulverização com GA₃ (Tabela 1). Esse resultado está de acordo com a literatura, onde um dos efeitos mais notáveis da giberelina é a promoção do alongamento do caule de plantas intactas, sem que haja aumento do número de entrenós (Sponsel, 1985; Almeida e Pereira, 1996; Auras, 1997).

Apesar do número de folhas não ter sido influenciado pela pulverização com GA₃ (Tabela 1), enfatiza-se que após a segunda pulverização com o fitorregulador, sete dias após a primeira aplicação (inicialmente, planejava-se a pulverização semanal), as plantas tratadas apresentaram folhas com coloração amarela, indicando efeitos de toxidez, perdendo algumas folhas. As pulverizações foram, por isso, realizadas quinzenalmente e as plantas não mais apresentaram esses sintomas. Assim sendo, era esperado que o número de folhas das plantas tratadas com giberelina fosse menor em relação às plantas

testemunhas. Segundo Almeida e Pereira (1996), a transformação de primórdios foliares ocorre mais rápido nas plantas tratadas com GA₃. Assim sendo, as plantas de *D. nobile* tratadas com giberelina tiveram o mesmo número de folhas das plantas testemunhas provavelmente porque, sob efeitos do fitorregulador, a maior velocidade do desenvolvimento e expansão foliar a partir de primórdios foliares compensou a perda inicial de algumas folhas nas plantas tratadas.

As folhas de plantas de *D. nobile* tratadas com GA₃ apresentaram maior comprimento, equivalendo em média a um incremento de 44% (Tabela 1). As folhas das plantas testemunhas foram, em média, 56,09% mais largas que as plantas tratadas com giberelina (Tabela 1). Auras (1997) também observou que a giberelina aumentou o tamanho das folhas de girassol, sugerindo que esse hormônio tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas. Almeida e Pereira (1996), Auras (1997) e Raven et al. (2001) relataram que, além de aumentar a velocidade do desenvolvimento de primórdios foliares, o GA₃ também promove aumento no tamanho das plantas intactas mediante estímulo tanto da divisão quanto do alongamento das células. As plantas de *D. nobile* tratadas com GA₃ apresentaram menor largura de suas folhas (Tabela 1) porque, sob efeitos do ácido giberélico, a direção da expansão celular é longitudinal (Raven et al., 2001).

A epinastia, movimento nástico por crescimento, foi observada em algumas folhas de *D. nobile* tratadas com GA₃. Nesse caso, a giberelina favoreceu uma maior taxa de crescimento na superfície superior da folha e, por isso, essas folhas curvaram-se para baixo, resultante do crescimento desigual.

6 Conclusão

O ácido giberélico nas concentrações de 50 a 400 mg.L⁻¹ é igualmente eficiente no alongamento de plantas *Dendrobium nobile* Lindl.

7 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J.A.S.; PEREIRA, M.F.D.A. Efeito de GA₃ e paclobutrazol no desenvolvimento vegetativo do girassol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.9, n.1, p.55-60, jan./abr. 1996.

APPLICATION of gibberellic acid. **Citrograph**, Los Angeles, v.81, n.11, p.3-16, Sep. 1996.

ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídeas**. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.

AURAS, N.E. **Efeitos do paclobutrazol sobre morfologia e anatomia foliar, crescimento de parte aérea, distribuição de biomassa e trocas gasosas em girassol**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CASPER, J.A.; TAYLOR, B.H. Growth and development of Young ‘Loring’ peach trees after foliar sprays of paclobutrazol and GA₃. **Hortscience**, Alexandria, v.24, n.2, p.240-242, Abr. 1989.

CHEN, W.E.; LIU, H.Y.; LIU, Z.H.; YANG, L.; CHEN, W.H. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.2, p.391-395, Feb. 1994.

COELHO, Y.S.; OLIVEIRA, A.A.R.; CALDAS, R.C. Efeitos do ácido giberélico (AG₃) no crescimento de porta-enxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.11, p. 1229-1232, nov. 1983.

CORDEIRO, J.A.D. **Crescimento, diferenciação e produção em plantas de sorgo granífero *Sorghum bicolor* (L.) Moench, tratadas com os ácidos giberélico-3 e α -naftalenoacético**. 1979. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

DAYKIN, A.; SCOTT, I. M.; FRANCIS, D.; CAUSTON, D. R. Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. **Planta**, Berlin, v.203, n.4, p.526-535, Abr. 1997.

FARIA, R.T.; ILLG, R.D. Orquídea: *Dendrobium nobile*. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.34-36.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIAO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, 50, n.292, p.719-726, nov./dez. 2003.

HUTTLY, A. K.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin regulated plant genes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.95, n.2, p.310-317, Feb. 1995.

JONES, W.E.; KUEHNLE, A.R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**, New York, v.82, n.2, p.189-194, Aug. 1998.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D. Efeitos de giberelinas, citocininas e do nitrato de potássio no crescimento e desenvolvimento do porta-enxerto de limoeiro 'Cravo'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, n.2-3, p.261-266, maio/dez. 1996.

MELTIVIER, J.R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1986, v.2, cap.4-5, p.93-162.

MENEGUCCI, J.L.P.; AMARAL, A.M.; SOUZA SOBRINHO, F.; SOUZA, M. Efeito do GA₃ e 2,4-D na época de colheita da laranja 'lima sorocaba'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.4, p.878-889, jul./ago., 2001.

MULLER, J.A.; YOUNG, M.J. Influence of gibberellic acid and effectiveness of several carriers on growth of sour orange (*Citrus aurantium* L.) seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v.17, n.4, p.673-674, Aug. 1982.

PIRES, E.P.J. Emprego de reguladores de crescimento em viticultura tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.40-43, jul. 1998.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

ROSSELL, C.E.V. **Obtenção de ácido giberélico por fermentação com *Gibberella fujikoroi***. 1971. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências de tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SACHS, R.M.; ALNG, A.; BRETZ, C.F.; ROACH, J. Shoot histogenesis, subapical meristematic activity in a caulescent and action of gibberellic acid and AMO-1618. **American Journal of Botany**, Columbus, v.47, n.1, p.260-266, Jan. 1960.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Growth responses to temperature. In: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 1985. p.409-425.

SHEEHAN, T.J. Recent advances in botany, propagation and physiology of orchids. **Horticultural Reviews**, New York, v.5, n.1, p. 279-315, 1983.

SIDAHMED, O.A. Effects of different levels of gibberellic acid (GA₃) on growth of sour orange (*Citrus aurantium*). **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.84, n.1, p.165-169, Jan. 1978.

SPONSEL, V.M. Gibberellins in *Pisum sativum* – their nature, distribution and involvement in growth and development of the plant. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.65, n.2, p.533-538, Feb.1985.

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**, Jena, v.161, n.8, p.929-935, Aug. 2004.

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

TREWAVAS, A. A how do plant growth substances work? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.4, n.1, p.203-228, Jan.1981.

ZIMMERMAN, J.K. Role of pseudobulbs in growth and flowering of *Catsetum viridiflavum* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.77, n.4, p.533-542, Apr. 1990.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	
Resumo das análises de variância para freqüência de estômatos, número das células epidérmicas, diâmetro polar dos estômatos, diâmetro equatorial dos estômatos, relação entre diâmetro polar e o diâmetro equatorial e índice estomático nas folhas diplóides e tetraplóides de <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.....	80
TABELA 2A	
Resumo das análises de variância para altura do pseudobulbo, diâmetro do pseudobulbo, número de folhas, número de entrenós do pseudobulbo, comprimento e largura da folha de plantas de <i>Dendrobium nobile</i> Lindl. tratadas com ácido giberélico.....	80

TABELA 1A - Resumo das análises de variância para frequência estomática (FE), número das células epidérmicas (NCE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DE), relação entre diâmetro polar e o diâmetro equatorial (DP/DE) e índice estomático (IE) nas folhas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005.

FV	GL	QM					
		FE	NCE	DP	DE	DP/DE	IE
Ploidia	1	706,053**	234,375**	126,0416**	51,042**	0,0092 ns	2,042 ns
Erro	22	74,270	22,3901	5,4507	6,3901	0,0032	0,7689
Total	23						
CV (%)		13,98	15,28	5,59	7,30	4,70	7,28

* e **, significativos a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo Teste F.

TABELA 2A - Resumo das análises de variância para altura do pseudobulbo (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de folhas (NF), número de entrenós do pseudobulbo (NE), comprimento (CF) e largura da folha (LF) de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. tratadas com ácido giberélico. UFLA, Lavras-MG, 2005.

FV	GL	QM					
		AP	DP	NF	NE	CF	LF
Doses	4	25,7955**	67,4658**	1,9853 ns	1,1424 ns	10,5484**	1,0049**
Erro	58	1,5264	4,2585	0,9222	0,7389	0,7414	0,2006
Total	62						
CV (%)		27,31	16,80	22,66	13,37	12,36	30,83

* e **, significativos a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo Teste F.