

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya loddigesii* 'Tipo':
FONTES DE NITROGÊNIO, QUALIDADE DE LUZ,
SACAROSE E ÁCIDO GIBERÉLICO**

APARECIDA GOMES DE ARAUJO

2007

APARECIDA GOMES DE ARAUJO

MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya loddigesii* 'Tipo':
FONTES DE NITROGÊNIO, QUALIDADE DE LUZ, SACAROSE E
ÁCIDO GIBERÉLICO

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

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2007

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser toda a minha inspiração, fonte de vida, força e energia.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Moacir Pasqual, pela amizade, orientação e ensinamentos importantes para a minha formação profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora, especialmente ao Professor Evaristo Mauro de Castro, pela co-orientação.

Aos demais professores desta Universidade, pela contribuição profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia pelo companheirismo em todos os momentos e aos alunos de iniciação científica (Adriene, Dalílhia, Danielle, Filipe, Joyce, Luzia e Ludmilla), pelo auxílio nos trabalhos executados.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Vantuil, Claret, Antônio Carlos e Evaldo), pelo convívio, ajuda e ensinamentos.

A minha família, pelo incentivo e confiança.

Ao Paulo Henrique, por estar presente em minha vida. Pelo carinho, companheirismo e pelos bons momentos juntos.

Às minhas amigas Maria Rosa, Talita, Mariele, Marina, Sandra, Fernanda, Alba, Chrystiane, Flávia Dionísio, Thyara, Gabriela e família, pela amizade.

Aos meus pais que em momento algum deixaram de acreditar em mim e investiram nos meus sonhos para torná-los realidade.

Aos meus tios e primos, por todo amor e encorajamento.

A todos que colaboraram para a realização desta etapa importante da minha vida, meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ARTIGO 1: Fontes de nitrogênio no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> 'Tipo'.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1 Introdução.....	4
2 Material e Métodos.....	7
3 Resultados e Discussão.....	8
4 Conclusões.....	13
Referências Bibliográficas.....	13
ARTIGO 2: Qualidade de luz e GA ₃ no crescimento <i>in vitro</i> de <i>Cattleya loddigesii</i> 'Tipo'.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1 Introdução.....	20
2 Material e Métodos.....	21
3 Resultados e Discussão.....	22
4 Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas.....	29
ARTIGO 3: Sacarose e qualidade de luz na propagação <i>in vitro</i> de plântulas de orquídea.....	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
1 Introdução.....	36
2 Material e Métodos.....	37
3 Resultados e Discussão.....	40
4 Conclusões.....	48
Referências Bibliográficas.....	49
ARTIGO 4: Características anatômicas e fitotécnicas de <i>Cattleya loddigesii</i> 'Tipo' sob diferentes ambientes de cultivo <i>in vitro</i>	52
Resumo.....	53
Abstract.....	54
1 Introdução.....	55
2 Material e Métodos.....	56
3 Resultados e Discussão.....	60
4 Conclusões.....	70
5 Considerações Finais.....	70
Referências Bibliográficas.....	71

RESUMO

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. **Micropropagação de *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico.** 2007. 74 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Este trabalho teve como objetivo estudar o crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’, assim como as alterações anatômicas em diferentes ambientes de cultivo *in vitro*. Foram conduzidos quatro experimentos avaliando: 1) influência das fontes de nitrogênio, nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L⁻¹) x nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L⁻¹); 2) qualidade de luz (amarela, azul, branca, verde e vermelha) x concentração de GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹); 3) ambientes de cultivo (CV: casa de vegetação; CVA: casa de vegetação com sombrite azul; CVV: casa de vegetação com sombrite vermelho; SC: sala de crescimento; SCA: sala de crescimento com sombrite azul; SCV: sala de crescimento com sombrite vermelho) x sacarose (0, 20, 40 e 60 g L⁻¹) e 4) efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre os frascos cultivados em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC). Os explantes utilizados foram plântulas oriundas de autofecundação e sementes germinadas *in vitro*, com 1 a 1,5 cm de comprimento, contendo raízes. As avaliações foram efetuadas aos 90 e 180 dias da instalação, quando se observou que a utilização do meio WPM sem o nitrato de cálcio favorece a micropropagação de *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’. O cultivo *in vitro* sob celofane vermelho aumenta o alongamento das plântulas. A presença de GA₃ interfere no desenvolvimento do sistema radicular e no acúmulo de biomassa. Maior crescimento *in vitro* é obtido com 15 g L⁻¹ de sacarose e sob condição de sala de crescimento, enquanto maior enraizamento e massa seca de plântulas são verificados com 45 g L⁻¹ de sacarose, independente do ambiente de cultivo. O ambiente de cultivo promove alterações anatômicas e fitotécnicas em *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’, durante o cultivo *in vitro*. O cultivo em casa de vegetação (luz natural) promove uma superfície foliar anatomicamente adaptada à fase de aclimatização.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Orientador); Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

ARAUJO, Aparecida Gomes de. **Micropropagation of *Cattleya loddigesii* 'Tipo': nitrogen sources, light quality, sucrose and giberelic acid.** 2007. 74 p. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The aim of this present work was to study the *in vitro* development of *Cattleya loddigesii* 'Tipo', as well as the anatomical alterations under different *in vitro* culture environments. Four separate experiments were made to evaluate: 1) The influence of different nitrogen sources, calcium nitrate (0, 278, 556, 834 and 1112 mg L⁻¹) x ammonium nitrate (0, 200, 400, 600 and 800 mg L⁻¹); 2) light quality (yellow, blue, white, green and red) x GA₃ concentrations (0; 2.5; 5.0; 10.0; and 20.0 mg L⁻¹); 3) culture environments (CV: greenhouse, CVA: greenhouse with a blue shading net, CVV: greenhouse with a red shading net, SC: artificial light growth room, SCA: artificial light growth room with a blue shading net, and SCV: artificial light growth room with a red shading net) x different sucrose concentrations (0, 20, 40 and 60 g L⁻¹); and 4) the effect of colored shading nets (red and blue) on the flasks cultivated in greenhouses (CV) and growth rooms (SC). The explants used were 1 to 1.5 cm in length plantlets produced by self pollinization flowers and *in vitro* germinated seeds, containing roots. The assessment were made after 90 and 180 days from the beginning of the experiment. It was verified that the use of WPM medium without calcium nitrate was the best treatment to the micropropagation of the *Cattleya loddigesii* 'Tipo'. The culture room environment with red cellophane enhances the elongation of the plantlets. The presence of GA₃ in the culture medium affected the rooting system development and also in the increase of the biomass. The best *in vitro* development was obtained with 15 g L⁻¹ of sucrose in a conventional growth room with artificial white lamps. However the highest rooting rates and dry weight of the plantlets were verified in the medium supplemented with 45 g L⁻¹ of sucrose, no influence of the culture environment was observed. The culture environment is responsible for the promotion of anatomical and morphological alterations in *Cattleya loddigesii* 'Tipo', during *in vitro* cultivation. The explants under a natural light greenhouse promoted the development of a well adapted leaf surface, in terms of anatomical variables, in the acclimatization phase.

* Guidance committee: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Adviser); Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-adviser).

ARTIGO 1

FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’

Aparecida Gomes de Araújo¹, Moacir Pasqual¹, Felipe Almendagna Rodrigues¹, Janice Guedes de Carvalho², Danielle Zampiere Arce Zarraga¹

¹ Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

E-mail: agaraujo2003@hotmail.com, mpasqual@ufla.br

² Departamento de Ciências do Solo (DCS), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência Rural

RESUMO

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. **Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Tipo'**. 2007. p. 1-16. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Embora as orquídeas sejam objeto de muita pesquisa, existem poucos trabalhos realizados na tentativa de se estudar fontes alternativas de nitrogênio no cultivo *in vitro*. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de nitrato de cálcio e nitrato de amônio no crescimento *in vitro* de orquídea. Plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' oriundas de autofecundação e sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, foram inoculadas em frascos contendo 60 mL de meio de cultura WPM modificado em suas concentrações de nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L⁻¹) x nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L⁻¹). O meio foi acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 150 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica' madura e 2 g L⁻¹ de carvão ativado, teve seu pH ajustado para 5,7±0,1 e foi solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar, antes da autoclavagem, a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, a 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e 35 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5 com cinco repetições de 5 plântulas cada. Decorridos 90 dias, observaram-se melhores resultados para número de folhas (9,14) com 400 mg L⁻¹ de nitrato de amônio e maior número de brotos (1,76) com 450 mg L⁻¹ de nitrato de amônio, enquanto que o maior número de raízes (4,3) foi obtido com 600 mg L⁻¹ de nitrato de amônio e 278 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio. Sendo assim, recomenda-se a utilização do meio WPM em sua composição original, sem nitrato de cálcio na micropropagação desta espécie. O enraizamento é favorecido com a utilização de 600 mg L⁻¹ de nitrato de amônio e 278 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio.

Palavras-chave: nitrato de cálcio, nitrato de amônio, *Cattleya*, micropropagação, orchidaceae.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Orientador); Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. Nitrogen sources in the *in vitro* development of the *Cattleya loddigesii* 'Típo' orchid 2007. p 1-16. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Although orchids have been the subject of many research works, there are a scarcities of references in attempts to study alternative nitrogen sources in its *in vitro* cultivation. This work aimed to evaluate the effect of different concentrations of calcium and ammonium nitrate on the *in vitro* development of orchids. *Cattleya loddigesii* 'Típo' orchid plantlets, 1.0 cm in size produced by self pollinization flowers and also by *in vitro* germinated seeds, were inoculated in flasks containing 60 mL of WPM culture medium, modified with different concentrations of calcium nitrate (0, 278, 556, 834, and 1112 mg L⁻¹) x ammonium nitrate (0, 200, 400, 600 and 800 mg L⁻¹). The culture medium was supplemented with 20 g L⁻¹ of sucrose, 150 g L⁻¹ of 'Nanica' banana pulp, activated charcoal 2 g L⁻¹, solidified with agar 6 g L⁻¹, and the pH was adjusted to 5.7 ± 0.1 before being autoclaved at 121°C, 1.5 atm pressure during 20 minutes. After inoculations, the flasks were transferred to a growth room with controlled temperature around 25±2°C, 16 h photoperiod regime, with a light intensity of 35 μmol m⁻² s⁻¹. The experimental design was a complete randomized in a factorial scheme of 5 x 5 with 5 replicates of 5 plantlets each. After 90 days, it was observed that the best results in terms of number of leaves (9.14) was achieved with 400 mg L⁻¹ of ammonium nitrate, and the highest number of sprouts (1.76) was obtained with 450 mg L⁻¹ of ammonium nitrate, but the major number of roots (4.3) was verified in the treatment with 600 mg L⁻¹ of ammonium nitrate and 278 mg L⁻¹ of calcium nitrate. In resume, it is recommended to use the WPM medium in its original composition, without calcium nitrate to micropropagate *Cattleya loddigesii* 'Típo' orchid plantlets. The best rooting was achieved with 600 mg L⁻¹ of ammonium nitrate and 278 mg L⁻¹ of calcium nitrate added in the medium.

Key words: calcium nitrate, ammonium nitrate, *Cattleya*, micropropagation, orchidaceae.

* Guidance committee: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Adviser); Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Cattleya loddigesii* ocorre nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, em locais situados entre 500 e 900m de altitude. Seu cultivo é mais fácil em locais de temperatura mais amena, protegidos da luminosidade excessiva, com maior umidade nos meses mais quentes e inverno mais seco. Seu período de florescimento vai do outono até a primavera. Produz flores de até 9 cm de diâmetro, com coloração desde o rosa-claro até o rosa mais intenso pintalgado, além da variedade alba (Araujo, 2004).

A cultura assimbiótica, ou sementeira *in vitro* de orquídeas, constitui uma técnica bastante relevante, do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas dessa forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental, resultando em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes muitas vezes espécie-específicos.

Neste contexto, a produção de orquídeas a partir de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, suprimindo, assim, a necessidade dos produtores de orquídeas na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

O meio de cultura utilizado na micropropagação é um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro* de orquídea. A fonte de sais minerais fornecida aos explantes é extremamente importante, assim como sua concentração. O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido principalmente, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos,

proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (Magalhães & Wilcox, 1987; Sakuta, 1987).

O efeito das diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e o desenvolvimento em cultura de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo também a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, tais como cenoura, roseira e várias outras espécies. No entanto, há espécies que não crescem bem com presença de nitrato no meio de cultura, como por exemplo, calos de arroz, indicando que este tecido é incapaz de utilizar o nitrato como fonte de N (Caldas et al., 1998).

Mercier & Kerbauy (1998), comparando fontes de nitrogênio (glutamina e NH_4NO_3) em *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae), verificaram que NH_4NO_3 induziu acréscimo nas concentrações de citocininas e, paralelamente, declínio no conteúdo de ácido indol acético (AIA). Além disso, proporcionou maiores massas fresca e seca em plântulas. No entanto, foi observado, em estudos com bromélias, que, dependendo do hábito da planta, há uma preferência pela forma de N orgânico que a planta utiliza.

Dijk & Eck (1995b) formularam meios de cultura com 0 a 12 mM L^{-1} de N, utilizando como fonte o NH_4NO_3 , e os testaram no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas de sementes de diversas espécies de *Dactylorhiza*. Assim, *D. incarnata* apresentou decréscimo na massa fresca, *D. praetermissa* incremento, enquanto *D. majalis* foi indiferente ao aumento das concentrações de N no meio.

Outro elemento, o cálcio, desempenha papel importante na morfogênese, por causa da interação com substâncias reguladoras de crescimento. Parece haver associação entre o cálcio e as citocininas, principalmente nas áreas onde está ocorrendo diferenciação. Segundo George et

al. (1988), a formação de protocormos a partir de calos de *Dendrobium fibriatum* foi baixa na ausência de cálcio.

Pelo fato de o cálcio ser um elemento pouco móvel dentro da planta e em decorrência da maior demanda dos tecidos mais jovens por esse elemento, sua importância na cultura *in vitro* assume um caráter particular. É transportado basicamente por processos passivos, os quais são extremamente influenciados pela taxa transpiratória. Dessa forma, muitas vezes, ocorrem sintomas de necrose nas gemas terminais, em consequência da baixa atividade transpiratória dos explantes cultivados *in vitro*. Esses sintomas podem ser evitados pela diminuição das taxas de crescimento, pela modificação do ambiente de cultura ou pelo aumento dos níveis de cálcio no meio (McCown & Sellmer, 1987).

O cálcio auxilia na desintoxicação de altas concentrações de outros elementos minerais na planta (Marschner, 1986) e exerce também função estrutural (atuando na formação da parede celular) e nos processos de divisão celular (Arruda, 2000).

A interação entre cálcio e amônio na produção de massa fresca em plântulas de orquídea *Dactylorhiza incarnata*, cultivadas *in vitro* e provenientes de sementes, foi pesquisada por Dijk & Eck (1995a). Para tanto, variaram as concentrações de amônio 0 a 8 mM L⁻¹, utilizando sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], em combinação com sulfato de cálcio (CaSO₄), nas concentrações de 0 a 2 mM L⁻¹. A biomassa foi alterada significativamente pelas concentrações de cálcio no meio. A concentração de 1 mM L⁻¹ proporcionou melhores respostas.

Embora as orquídeas sejam objeto de muita pesquisa, existem poucos trabalhos realizados com essa espécie, na tentativa de se estudar fontes alternativas de nitrogênio no cultivo *in vitro*. Com o objetivo de otimizar o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', avaliou-se o

efeito de concentrações de nitrato de cálcio ($\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e nitrato de amônio (NH_4NO_3).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com, aproximadamente, 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em frascos com capacidade para 250 cm³, contendo 60 mL de meio de cultura. Após um ensaio prévio, determinou-se o melhor meio para essa espécie como sendo o -Wood Plant Medium (WPM) de Lloyd & McCown (1980).

Os tratamentos consistiram de concentrações de nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L⁻¹) e de nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L⁻¹) em todas as combinações possíveis. O meio foi acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 150 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica' madura, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1, antes da autoclavagem, a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e 35 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa, onde permaneceram por 90 dias. Os parâmetros analisados foram: número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm) e massa seca de plântulas (g).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, com cinco repetições de 5 plântulas cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por regressão polinomial, com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros avaliados número de folhas, de brotos e de raízes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A interação foi significativa para número de folhas e raízes, enquanto o fator nitrato de amônio foi significativo apenas para número de brotos. As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea em cm (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes em cm (CR) e massa seca de plântulas em g (MSP), em plântulas de *Canleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de cálcio. Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MSP
Ca(NO ₃) ₂	4	8,9756**	0,3971 ^{ns}	0,2306 ^{ns}	0,7470 ^{ns}	0,7008 ^{ns}	0,00007 ^{ns}
NH ₄ NO ₃	4	3,7586 ^{ns}	0,7456*	0,7556 ^{ns}	1,3490*	3,4616 ^{ns}	0,00012 ^{ns}
Ca(NO ₃) ₂ x NH ₄ NO ₃	16	4,0196*	0,3276 ^{ns}	0,3916 ^{ns}	1,1447**	1,3640 ^{ns}	0,00017 ^{ns}
Resíduo	75	1,9825	0,2344	0,4088	0,5031	1,4247	0,00013
CV (%)		22,05	29,32	26,61	27,18	24,59	58,87

** , * significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns – não significativo

Pelo teste F, apenas a concentração de 400 mg L⁻¹ de nitrato de amônio proporcionou significância na interação com nitrato de cálcio para número de folhas. Melhores resultados foram observados com a utilização de 400 mg L⁻¹ de nitrato de amônio, na ausência de nitrato de cálcio (Figura 1), ocorrendo a formação média de 9,14 folhas por explante. Essa concentração de nitrato de amônio corresponde à concentração original do meio WPM.

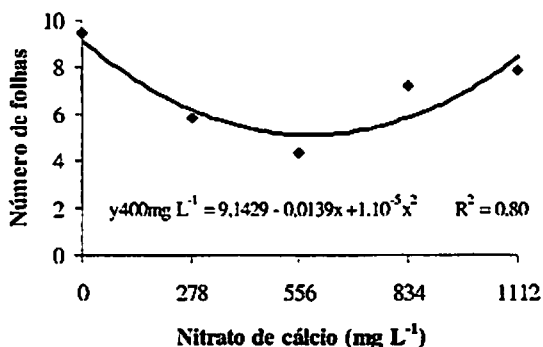


Figura 1 Número de folhas em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de nitrato de cálcio e 400 mg L⁻¹ de nitrato de amônio. Lavras, MG. 2007.

Observou-se que não há necessidade da utilização de nitrato de cálcio no meio WPM para estimular emissão de folhas. Contudo, o meio WPM contém uma outra fonte de cálcio, o cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O). No entanto, Kanashiro (2005) recomenda a utilização de 9,38 mM L⁻¹ de nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂.4H₂O] como fonte de cálcio a ser adicionada ao meio líquido MS modificado em vez de CaCl₂.2H₂O, para crescimento *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae).

À medida que houve incremento nas doses de nitrato de cálcio, registrou-se redução no número de folhas até a concentração de 695 mg L⁻¹, a partir da qual verificou-se aumento crescente do número de folhas (6,05) até a dose máxima utilizada (1112 mg L⁻¹). Pode-se, assim, inferir que o efeito estimulante do nitrato de cálcio continuaria e ou estabilizaria em concentrações superiores.

Sato et al. (2001), estudando a influência da concentração de nitrato de amônio, com e sem BAP, na micropropagação da mandioca (*Manihot*

A diferença de 0,38 brotos observada entre os tratamentos com 0 e 450 mg L⁻¹ de nitrato de amônio pode ser explicada, provavelmente, pelo fato de a polpa de banana ter suprido grande parte do nitrogênio utilizado pelo explante, na ausência de nitrato de amônio.

Poddar et al. (1997), em *Eleusine coracana* L., observaram que concentrações de duas a seis vezes maiores de nitrato de amônio, utilizadas no meio MS (Murashige & Skoog, 1962), podem favorecer a regeneração de brotos na ausência do regulador de crescimento. Já em altas concentrações de nitrato de amônio e de ANA, o meio de cultura tornou-se tóxico. De acordo com os mesmos autores, o nitrato pode funcionar como um regulador de crescimento, estimulando brotações. Similarmente, Silva et al. (2005) registraram que o incremento das concentrações de nitrato de amônio, na ausência de cinetina, aumentou o número de gemas e brotos em *Dyckia maritima* (Bromeliaceae).

Mercier & Kerbauy (1991) constataram que distintas fontes de nitrogênio provocam diferenças nas taxas de síntese de certas substâncias, como 2iP, zeatina e clorofila, assim como na atividade metabólica e no desenvolvimento de protocormos de orquídeas.

De acordo com George & Sherrington (1984), o desenvolvimento e a morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido. Segundo Sakuta (1987) altas concentrações de amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados estão relacionados com a própria função metabólica do nitrogênio, como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

O estudo de diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de cálcio em meio WPM altera a razão das fontes de nitrogênio NH₄⁺/NO₃⁻. Esta razão parece ser determinante no crescimento *in vitro*, devendo o amônio ser, no

máximo, 1/3 do N total. Esse desequilíbrio de íons pode ter influenciado os resultados obtidos no presente estudo.

4 CONCLUSÕES

Para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', recomenda-se a utilização do meio de cultura WPM em sua formulação original, sem o nitrato de cálcio. O enraizamento é favorecido com a utilização de 600 mg L⁻¹ de nitrato de amônio e 278 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, V. A.; SILVA, A. B.; SOARES, G. A. Concentração de KNO₃ e NH₄NO₃ no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2005.
- ARAÚJO, D. de. Cultivo de Orquídeas – *Cattleya*, as mais belas orquídeas brasileiras. *Revista Brasil Orquídeas*, São Paulo, n. 8, p. 18-26, jan./mar. 2004.
- ARRUDA, S. C. C. Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla*. 2000. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas*. Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1998. p. 87-132.
- DIJK, E.; ECK, N. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist*, Cambridge, v. 131, n. 3, p. 361-367, Nov. 1995a.
- DIJK, E.; ECK, N. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus response of some Dutch marsh orchids. *New Phytologist*, Cambridge, v. 131, n. 3, p. 353-359, Nov. 1995b.

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.

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media**. Edington: British Library, v. 2, 1988.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

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

KANASHIRO, S. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchatiana* (Baker) L. B. Smith *in vitro*. 2005. 187 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAGALHÃES, J. R.; WILCOX, G. E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 6, p. 576-585, jun. 1987.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 10, n. 3, p. 225-228, set./dez. 1998.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 647 p.

McCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 2, p. 4-16.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 138, n. 2, p. 195-199, June 1991.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 225-228, set./dez. 1998.

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

NUNES, F. C.; VILLA, F.; PIO, L. A. S.; RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M. Efeito de nitrato de cálcio e cloreto de potássio na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de 'Kobber' In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45.; CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza, **Anais..** Fortaleza-CE, 2005. p. 626.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, Clare, v. 129, n. 1, p. 101-106, Oct. 1997.

SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 459-463, 1987.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 278, p. 405-413, jul./ago. 2001.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J. M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 369-371, jul./set. 2005.

TAKANE, R. J. **Influência da sacarose e do cloreto de cálcio na aclimação e no crescimento inicial de plântulas de *Oncidium varicosum* Lindl. & Paxton (Orchidaceae) germinadas *in vitro***. 2002. 79 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal.

ARTIGO 2

QUALIDADE DE LUZ E GA₃ NO CRESCIMENTO *in vitro* DE *Cattleya loddigesii* 'Tipo'

Aparecida Gomes de Araújo¹, Moacir Pasqual¹, Felipe Almendagna Rodrigues¹, Joyce Dória Rodrigues¹, Evaristo Mauro de Castro², Adriene Matos Santos¹

¹ Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

E-mail: agaraujo2003@hotmail.com, mpasqual@ufla.br

² Departamento de Biologia (DBI), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

Preparado de acordo com as normas da Revista Plant Cell Culture & Micropropagation

1 INTRODUÇÃO

A realização de propagação vegetativa utilizando-se técnicas de cultura de tecidos pode ser um valioso instrumento na multiplicação rápida de mudas de orquídeas, uma vez que o processo convencional é extremamente lento.

A composição do meio de cultura e a concentração dos reguladores de crescimento são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento das plantas, na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Caldas et al., 1998). Segundo estes mesmos autores, as giberelinas, a exemplo do ácido giberélico (GA_3), não são comumente incluídas nos meios de cultivo, em razão do suprimento endógeno ser suficiente para os processos morfogênicos. Porém, quando plantas produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas, devido ao seu tamanho, o cultivo na presença de GA_3 pode provocar o alongamento em algumas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998) e, conseqüentemente, um maior número de indivíduos poderá ser transferido para casa de vegetação.

Em plantas como macela (*Egletes viscosa*), a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 proporcionou satisfatório crescimento dos explantes (Diniz et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2001), sendo a concentração de 10 mg L^{-1} de GA_3 responsável pelo maior número de folhas e brotos em gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.). Entretanto, Oliveira (1994) observou que a adição de GA_3 ao meio de cultura não proporcionou incremento no tamanho e no número de brotos novos em crisântemo (*Dendranthema grandiflora*).

A qualidade da luz utilizada nas salas de crescimento é também de suma importância na morfogênese *in vitro*. Estudando o desenvolvimento *in vitro* de brotos de ameixeira (*Prunus* sp.), Muleo et al. (2001) demonstraram que, enquanto a luz azul aumentou o número de brotos axilares produzidos a partir do meristema apical, a luz vermelha promoveu crescimento caulinar.

Outros estudos também indicam que os diferentes estágios do processo de organogênese podem responder diferentemente ao espectro luminoso. Affonso et al. (2003), analisando o desenvolvimento de camomila (*Chamomila recutita*) em diferentes espectros luminosos, registraram que o tratamento com luz vermelha foi o que induziu maior produção de brotos/planta. O número de raízes não foi afetado pela luz vermelha, porém, as luzes azuis e verdes inibiram o desenvolvimento radicular. Raízes mais longas foram observadas em plantas cultivadas sob luz vermelha, o que proporcionou um melhor desenvolvimento de plantas. Já Zaguini et al. (2003), avaliando o efeito de diferentes espectros de luz no desenvolvimento *in vitro* de *Artemisia absinthium* L., verificaram que a luz vermelha induziu à formação de maior número de brotos por planta. Além disso, explantes mantidos sob luz branca + UV-A, azul e verde produziram plantas maiores.

Poucos estudos têm sido realizados buscando-se compreender o efeito da qualidade de luz no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto, esses têm demonstrado que a qualidade da luz influencia a eficiência biológica dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos (Erig & Schuch, 2005).

Com o objetivo de otimizar o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' avaliaram-se diferentes concentrações de ácido giberélico e diferentes espectros de luz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com, aproximadamente, 1 cm de comprimento e com raízes foram utilizadas como explantes.

Após um ensaio prévio, determinou-se que o melhor meio para essa espécie é o WPM (Lloyd & McCown, 1980), o qual foi suplementado com diferentes concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10 e 20 mg L⁻¹), acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 150 g L⁻¹ de polpa de banana 'Nanica' madura, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1.

Verteram-se 60 mL de meio em frascos de vidro com capacidade para 250 cm³, vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,5 atm e à temperatura do 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos contendo cinco plântulas cada, foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de, aproximadamente, 35 μmol m⁻² s⁻¹.

As culturas foram submetidas a diferentes qualidades de luz (branca, azul, amarela, verde e vermelha), obtidas com a utilização de duas folhas de papel celofane envolvendo os frascos de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5, com três repetições com cinco plântulas cada. Decorridos 90 dias da instalação do experimento avaliaram-se número de folhas, número de brotos, número e comprimento de raízes (cm), comprimento da parte aérea (cm) e massa fresca de plântulas (g). Os dados foram analisados empregando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000), por meio de regressão polinomial para concentrações de GA₃ e teste de Scott-Knott, para tipos de luz, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação significativa entre os fatores estudados para qualquer uma das variáveis analisadas. O comprimento da parte aérea e o comprimento de raízes apresentaram significância dos fatores estudados

isoladamente, enquanto que as variáveis número de raízes e massa fresca de plântulas apresentaram significância apenas para o fator GA₃. Houve significância apenas para o fator luz quando se estudou o número de folhas. O número de brotos não foi afetado pelos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e massa fresca de plântulas (MFP), em *Canleya loddigesii* 'Tipo' cultivada sob diferentes qualidades de luz. Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MFP
Luz	4	22,5495*	1,0581 ^{ns}	2,5383**	1,7198 ^{ns}	2,6541*	0,0101 ^{ns}
GA ₃	4	17,7822 ^{ns}	1,1035 ^{ns}	1,0550*	8,2965*	15,4667**	0,1915*
Luz x GA ₃	16	7,3339 ^{ns}	0,6552 ^{ns}	0,2920 ^{ns}	1,0027 ^{ns}	1,3131 ^{ns}	0,0173 ^{ns}
Resíduo	50	7,7922	0,4596	0,3144	0,7465	0,8733	0,0098
CV (%)		31,28	32,82	19,35	22,38	20,37	42,58

**, * significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns - não significativo

Os resultados para número de brotos assemelham-se àqueles obtidos por Yui et al. (1990) que, trabalhando com macieira 'Golden Delicious', observaram que não houve diferença significativa entre as doses de GA₃ (0 até 1,0 mg L⁻¹) para esta variável.

O ácido giberélico, em meio de cultura, normalmente diminui ou impede a formação de raízes, brotações ou embriões somáticos (Pasqual, 2001).

Maior número de folhas (11,07) foi verificado quando as plântulas foram cultivadas sob papel celofane azul (Tabela 2). Segundo Erig & Schuch (2004), o cultivo de macieira sob celofane vermelho e em sala de crescimento com 4,4 µM de BAP no meio de cultura possibilita a obtenção de maior número de gemas e taxa de multiplicação nas cultivares Matergala e Galaxy e, conseqüentemente, maior número de folhas.

Tabela 2 Número de folhas, comprimento de raízes e da parte aérea em plântulas de *Cantleya loddigesii* 'Tipo', cultivadas em diferentes qualidades de luz. Lavras, MG. 2007.

Qualidade de luz	Número de folhas	Comprimento de raízes (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)
Amarela	8,56 b	4,24 b	2,78 b
Azul	11,07 a	4,59 b	2,74 b
Branca	7,96 b	5,25 a	2,54 b
Verde	8,64 b	4,66 b	2,82 b
Vermelha	8,40 b	4,20 b	3,61 a
CV (%)	31,28	20,37	19,35

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Dignart (2006) não observou diferenças significativas para número de folhas de *Cantleya walkeriana*, em sala de crescimento, independente da utilização de malhas fotoconversoras coloridas (vermelha e azul). No entanto, Silva & Debergh (1997) verificaram diferenças para esta variável em tratamentos de alteração de qualidade espectral, em plântulas de *Azorina vidalii*.

As plântulas apresentaram maior crescimento em altura (3,61 cm) sob cultivo em celofane vermelho (Tabela 2). As demais condições de luz tiveram resultados semelhantes, porém, inferiores. Resultados distintos foram encontrados por Erig & Schuch (2004), que registraram melhores resultados para número e comprimento de brotos na cv. Matergala de macieira, sob cultivo em luz amarela (celofane). Já na cv. Galaxy, a qualidade de luz não alterou esses parâmetros.

Zaguini et al. (2003) registraram que a luz azul induziu maior alongamento e maior biomassa em plântulas de artemísia, enquanto a luz vermelha inibiu o desenvolvimento.

A radiação vermelha, de modo geral, promove alongamento de parte aérea, como já foi constatado em diversos estudos, com alteração na qualidade de luz (Marks & Simpson, 1999; Silva & Debergh, 1997). No entanto, esse

da qualidade de luz sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas está fortemente associada à espécie vegetal (Antonopolou et al., 2004; Hunt & Burrit, 2001).

Segundo George (1996), a luz vermelha estimula o enraizamento em muitas espécies, porém, neste trabalho, o comprimento de raízes foi afetado apenas pela luz branca (5,25 cm). Os demais tratamentos de luz tiveram resultados semelhantes (Tabela 2), porém, inferiores ao da luz branca (sala de crescimento convencional). Estes resultados concordam com os de Antonopolou et al. (2004), que encontraram melhores taxas nos parâmetros de enraizamento sob radiação branca, isso porque as folhas irradiadas com luz branca absorvem mais os comprimentos de ondas azul, vermelho e verde, necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos.

Avaliando-se o efeito do GA₃, constata-se que melhores respostas para comprimento de parte aérea (Figura 1) foram registradas na ausência do regulador de crescimento (3,26 cm), como encontraram Santana et al. (2005) para alecrim-pimenta. A incorporação de GA₃ ao meio WPM teve pouca influência no desenvolvimento da parte aérea. Doses crescentes de GA₃ reduziram gradativamente o comprimento da parte aérea.

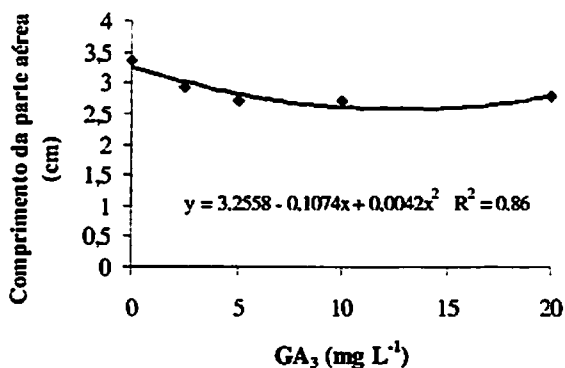


Figura 1 Comprimento de parte aérea (cm) em plântulas de *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’ cultivadas em diferentes concentrações de GA₃. Lavras, MG. 2007.

Por outro lado, Araujo et al. (2005), em estudos com orquídea (*Laeliocattleya* x *Cattleya walkeriana*), verificaram melhores respostas para altura de plântulas em meio WPM com 10 mg L⁻¹ de GA₃. Da mesma forma, Moreira et al. (2005) obtiveram maior alongamento de plântulas de *Cattleya aclandae* com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de GA₃ associado a 0,5 mg L⁻¹ de ANA. O alongamento de parte aérea e brotações laterais podem ser afetados em diferentes faixas do espectro pela alteração na concentração de auxinas e giberelinas das plantas (Silva & Debergh, 1997).

Pelo gráfico da Figura 2, observa-se que maior comprimento de raízes (5,39 cm) foi registrado na ausência de giberelina. Doses crescentes do fitorregulador promoveram decréscimo nesta variável.

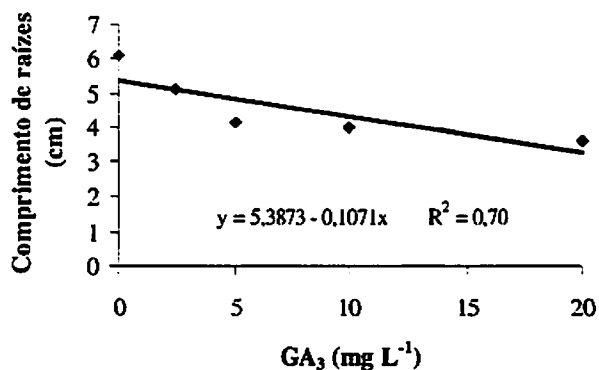


Figura 2 Comprimento de raízes (cm) em plântulas de *Canleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em diferentes concentrações de GA₃. Lavras, MG. 2007.

O maior número de raízes (4,46) foi verificado na ausência da giberelina (Figura 3). A qualidade de luz não influenciou o número de raízes, fato também constatado por Affonso et al. (2003) em camomila.

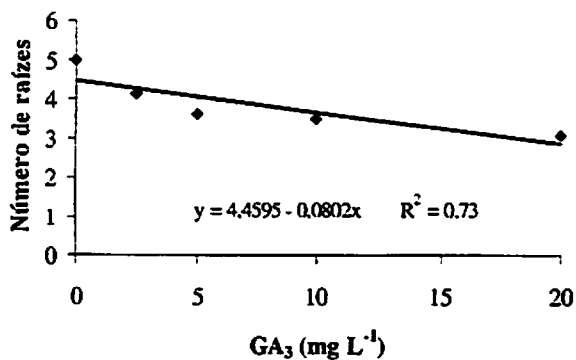


Figura 3 Número de raízes em plântulas de *Canleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em diferentes concentrações de GA₃. Lavras, MG. 2007.

O efeito ora inibitório, ora estimulatório dos reguladores de crescimento na formação de brotos e raízes em diferentes plantas pode estar associado à

própria concentração, bem como a absorção dos reguladores de crescimento pelo substrato (George, 1996).

A maior massa fresca de plântulas (0,376g) foi verificada também na ausência do regulador de crescimento (Figura 4). Com aumento nas concentrações de GA₃ adicionadas ao meio WPM, houve decréscimo nessa variável.

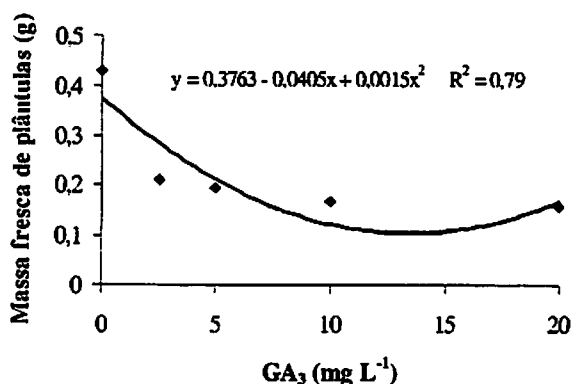


Figura 4 Massa fresca de plântulas (g) de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em diferentes concentrações de giberelina. Lavras, MG. 2007.

De forma similar, Araujo et al. (2005), testando GA₃ em *Laeliocattleya* x *Cattleya Walkeriana* e Silva (2001), em gloxínia, verificaram melhores resultados para a produção de massa fresca de plântulas, na ausência desse regulador de crescimento.

Para que se obtenha sucesso no processo de micropropagação, existe a necessidade de se ajustar, para cada espécie e ou cultivar, as melhores condições de cultivo (Zimmerman, 1981), ou seja, as concentrações mais apropriadas de reguladores de crescimento e o ambiente no qual serão mantidos os explantes.

No presente trabalho, a adição de GA₃ no meio interferiu negativamente no desenvolvimento do sistema radicular e no acúmulo de biomassa das plântulas. O cultivo sob celofane vermelho induziu alongamento de parte aérea e

o cultivo em sala de crescimento (luz branca) induziu o crescimento de raiz. Ressalta-se que em papel celofane de cor vermelha, todos os comprimentos de onda são absorvidos e o vermelho, refletido.

4 CONCLUSÕES

O cultivo em sala de crescimento sob celofane vermelho aumenta o alongamento das plântulas.

A presença de GA₃ interfere negativamente no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cantleya loddigessi* 'Tipo'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, V. R.; LIMA, S. S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. Análise do desenvolvimento de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert em diferentes espectros luminosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras, MG. Anais.. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 372.

ANTONOPOULOU, C.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 549-553, 2004.

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, A. L. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 2, p. 612, set. 2005. Suplemento.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** 132 p. 2006. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH M. W. **Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade de luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala.** *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, RS, v. 12, n. 2, p. 151-155, abr./jun. 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCH M. W. **Tipo de luz na micropropagação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, v. 27, n. 3, p. 488-490, dez. 2005.

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. 225-258.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology.** 2. ed. Edington Limited, 1996. 1574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. **Micropropagação.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

HUNTER, D. C.; BURRIT, D. J. **Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa*).** *In vitro Cellular and Development Biology of Plants*, New York, v. 40, n. 2, p. 215-220, Mar./Apr. 2001.

LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.** *International Plant Propagation Society Proceedings*, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. **Effect of irradiance on shoot development *in vitro*.** *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 133-142, June 1999.

MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P.; TELES, S.; COSTA, M. A. P. C.; ALMEIDA, W. A. B. Efeito de giberelina e auxina no alongamento *in vitro* de *Cantleya aclandae*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 655, set. 2005. Suplemento.

MULEO, R.; MORINI, S.; CASANO, S. Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. **In vitro Cellular Development Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 5, p. 609-617, Sept./Oct. 2001.

OLIVEIRA, P. D. Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tezlev.) cv. Orange Reagen. 1994. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PASQUAL, M. Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

SANTANA, W. M. S.; COSTA, A. S.; MENDONÇA, A. B.; BLANK, M. F. A.; BLANK, R. I. A. F. Influência do ácido giberélico no alongamento de brotações *in vitro* de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 510, set. 2005. Suplemento.

SILVA, A. B. Efeito de diferentes concentrações de BAP e GA₃ na multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.). 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, M. H.; DEBERGH, P. C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 187-193, 1997.

ZAGUINI, T.; LIMA, S. S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. Desenvolvimento *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) sob diferentes qualidades de luz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais..** Lavras: UFLA, 2003. p. 107.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 120, p. 217-222, 1981.

YUI, E.; CORRÊA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.
Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh.) cultivar Golden
Delicious. *Ciência e Prática*, Lavras, v. 14, n. 1, p. 56-61, jan./abr. 1990.

ARTIGO 3

SACAROSE E QUALIDADE DE LUZ NA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA

**Aparecida Gomes de Araújo¹, Moacir Pasqual¹, Evaristo Mauro de Castro²,
Felipe Almendagna Rodrigues¹, Dalíhia Nazaré dos Santos²**

¹ Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

E-mail: agaraujo2003@hotmail.com; mpasqual@ufla.br

² Departamento de Biologia (DBI), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

Preparado de acordo com as normas da Revista Ceres

RESUMO

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. **Sacarose e qualidade de luz na propagação *in vitro* de plântulas de orquídea**. 2007. p. 33-51. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O cultivo *in vitro* sob condições adequadas de luz e de concentração de sacarose pode influenciar no crescimento dos explantes, fazendo com o processo de micropropagação seja mais econômico e se obtenham mudas de melhor qualidade. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura WPM, na micropropagação de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', possibilitando uma otimização no processo de produção *in vitro*. Plântulas oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com 1,0 cm de comprimento e contendo raízes foram inoculadas em frascos contendo 60 mL de meio WPM acrescido de concentrações de sacarose (0, 20, 40 e 60 g L⁻¹) e adicionados de carvão ativado (2 g L⁻¹), solidificado com ágar (6 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos. Os frascos (5 plântulas/frasco) foram mantidos em diferentes ambientes de cultivo (CV: casa de vegetação; CVA: casa de vegetação com sombrite azul; CVV: casa de vegetação com sombrite vermelho; SC: sala de crescimento; SCA: sala de crescimento com sombrite azul; SCV: sala de crescimento com sombrite vermelho). Decorridos 90 dias, verificou-se melhor crescimento *in vitro* em meio WPM com 15 g L⁻¹ de sacarose e cultivo em sala de crescimento convencional. Maior enraizamento e massa seca de plântulas foram verificados em meio com 45 g L⁻¹ de sacarose, independente do ambiente de cultivo. Para crescimento de raízes recomenda-se cultivo sob sombrite vermelho em sala de crescimento.

Palavras-chave: qualidade de luz, sacarose, *Cattleya*, micropropagação, orchidaceae.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Orientador); Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

ARAUJO, Aparecida Gomes de. **Effect of Sucrose concentrations and light quality for the improvement of *in vitro* propagation of orchid plantlets.** 2007. p. 33-51. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Sucrose concentrations and light quality are important conditions to provide a less cost in the micropropagation process. The better conditions of these factors can yield a high quality micropropagated plantlets. The aim of this work was to evaluate the different light quality and sucrose concentrations supplemented to the WPM medium in micropropagation of *Cattleya loddigesii* 'Típo'. Plantlets with roots and 1.0 cm in length, produced by self pollinization of its flowers and also by seeds *in vitro* germination, were inoculated in flasks with a 60 mL of WPM medium supplemented with different sucrose concentrations (0, 20, 40 and 60 g L⁻¹) and activated charcoal (2 g L⁻¹). The medium was solidified with agar (6 g L⁻¹) and the pH adjusted to 5.8 previously to autoclavation at 121°C during 20 minutes. The flasks (5 plantlets/flask) were kept under different culture environments (CV: greenhouse, CVA: greenhouse with a blue shading net, CVV: greenhouse with a red shading net, SC: growth room, SCA: growth room with a blue shading net, SCV: growth room with a red shading net). After 90 days, the best *in vitro* development was obtained with WPM medium supplemented with 15 g L⁻¹ of sucrose under the environment of a normal growth room (SC). The best rooting of the explants and the highest dry biomass of the plantlets were observed in the medium supplemented with 45 g L⁻¹ of sucrose, there was no interference of the culture environment in the rooting. Therefore, it is recommended to cultivate the flasks under a red shading net, inside a normal growth room to promote a better rooting of the explants.

Key words: Light quality, sucrose, *Cattleya*, micropropagation, orchidaceae.

* Guidance committee: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Adviser); Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito da qualidade de luz no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto, esses estudos têm demonstrado que a qualidade da luz pode alterar a concentração de carboidrato e hormônios dentro da planta (Almeida & Mundstock, 2001; Erig & Schuch, 2005).

A qualidade da luz utilizada nas salas de crescimento é de suma importância na morfogênese *in vitro*. Para o desenvolvimento *in vitro* de brotos de ameixeira (*Prunus* sp.), Muleo et al. (2001) demonstraram que, enquanto a luz azul aumentou o número de brotos axilares produzidos a partir do meristema apical, a luz vermelha estimulou a dominância apical. Dignart (2006), testando o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre frascos contendo plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivados em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC), verificou que CV-com sombrite azul resultou em maior número de brotos.

O excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (Yamada & Sato, 1978). Foi observado aumento na taxa de fotossíntese, em subculturas sucessivas, quando a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹ (Pasqual, 2001). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente devido a uma menor propensão de crescimento de fungos e bactérias (Prakash et al., 2004).

Dignart (2006) obteve resultados similares para número de folhas, número de brotações e comprimento de parte aérea, em *Cattleya walkeriana*, testando as concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose. Faria et al. (2004),

estudando o crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile*, sob diversas concentrações de sacarose no meio MS com metade da concentração de macronutrientes, verificaram maior crescimento em altura ($4,21 \pm 0,91$ cm) e altas taxas de multiplicação (1:4) com 60 g L^{-1} de sacarose.

Tavares (2006) recomenda o cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage em casa de vegetação e redução na concentração de sacarose do meio MS pela metade (15 g L^{-1}), sem causar prejuízo ao desenvolvimento dos explantes.

Com o objetivo de otimizar o processo de micropropagação de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' avaliaram-se diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura WPM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Tipo', oriundas de sementes produzidas por autopolinização e germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em frascos de vidro (5 plântulas/frasco) com capacidade para 250 cm^3 , contendo 60 mL de meio de cultura WPM-Wood Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980), acrescido de sacarose (0, 20, 40 e 60 g L^{-1}), carvão ativado (2 g L^{-1}), ágar (6 g L^{-1}) e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem, a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas e filme plástico e, em seguida, transferidos para diferentes condições de incubação (CV: casa de vegetação; CVA: casa de vegetação sob sombrite de malha azul; CVV: casa de vegetação com sombrite de malha vermelha; SC: sala de crescimento; SCA: sala de crescimento com sombrite de malha azul; SCV: sala de crescimento com sombrite de malha vermelha).

O material foi colocado diretamente sobre as bancadas em casa de vegetação e sob malhas fotoconversoras (Figura 1). As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries[®]. Utilizou-se a malha ChromatiNet Vermelha 50%, que reduz ondas azuis, verdes e amarelas e acrescenta ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. Outro tratamento foi com a malha ChromatiNet Azul 50%, que reduz ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescenta ondas azuis.



Figura 1 Visão geral das plântulas mantidas em casa de vegetação e sob malhas coloridas. Lavras, MG. 2007.

Foram cultivadas também plântulas em frascos mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e radiação de $5,52 \text{ W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), para servirem como tratamento controle. Em sala de crescimento, foram testadas também as coberturas coloridas CromatiNet vermelha e azul (Figura 2).



Figura 2 Ambientes de cultivo dos frascos mantidos em sala de crescimento convencional, com o uso de diferentes malhas coloridas. Lavras, MG. 2007.

A intensidade da radiação (Tabela 1) foi mensurada por meio de sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

Tabela 1 Radiação média ($\text{MJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) observada nos microambientes em casa de vegetação e sala de crescimento. Lavras, MG. 2007.

Ambiente	Radiação	Ambiente	Radiação
CV	3,15	SC	3,33
CVV	2,31	SCV	1,30
CVA	3,15	SCA	1,61

CV:casa de vegetação; CVV:casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA:casa de vegetação com sombrite azul; SC:sala de crescimento; SCV:sala de crescimento com sombrite vermelho e SCA:sala de crescimento com sombrite azul.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x6, com cinco repetições e cada repetição constituída de 5 plântulas. Os dados foram comparados pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000). O experimento foi avaliado após 90 dias da instalação, considerando-se: número de folhas e número de brotos por explante, comprimento de parte aérea (cm),

número de raízes por explante, comprimento de raízes (cm) e massa seca total de plântulas (g).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura e as diferentes qualidades de luz, para as características comprimento de parte aérea e comprimento de raízes. Número de folhas e de brotos apresentaram significância isolada para ambos os fatores estudados. Número de raízes e massa seca de plântulas apresentaram efeito significativo apenas entre os níveis de sacarose (Tabela 2).

Tabela 2 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea em cm (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes em cm (CR) e massa seca de plântulas em g (MSP). Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MSP
Luz (L)	5	13,9582**	0,7480*	3,3578**	1,7597 ^{ns}	1,1051**	0,0004 ^{ns}
Sacarose (S)	3	33,2488**	0,0172**	1,7270**	9,5875**	5,6954**	0,0026**
L x S	15	4,5535 ^{ns}	0,3948 ^{ns}	0,7236**	0,5633 ^{ns}	0,5823**	0,0003 ^{ns}
Resíduo	83	3,2768	0,2460	0,2505	0,7571	0,2404	0,0002
CV (%)		24,51	30,37	28,05	36,63	32,12	50,58

** , * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns – não significativo

Analisando-se a Figura 3, após derivação da equação, verifica-se que houve melhores respostas (7,97) para número de folhas, quando foram utilizados 15 g L⁻¹ de sacarose. Na ausência de sacarose, observaram-se 7,77 folhas por explante. Porém, a omissão total da sacarose no meio não é recomendada, pois não há fornecimento de outra fonte de carboidrato para os explantes.

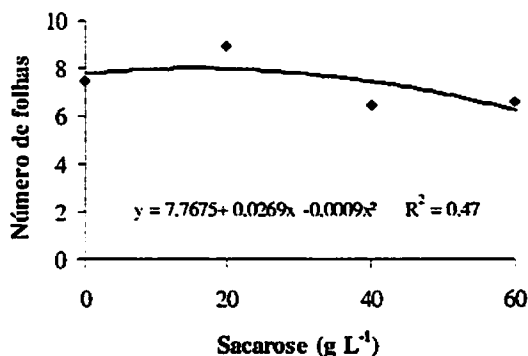


Figura 3 Número de folhas em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

O cultivo em sala de crescimento (SC) e o realizado em sala de crescimento com sombrite vermelho (SCV) proporcionaram melhores resultados para essa variável, apresentando 8,74 e 8,31 folhas, respectivamente. O uso de sombrite azul em SC promoveu resultados inferiores, porém, semelhantes àqueles observados em casa de vegetação com e sem sombrites coloridos (Tabela 3).

Tabela 3 Número de folhas (NF) e de brotos (NB) em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em meio WPM, sob diferentes qualidades de luz. Lavras, MG. 2007.

Tratamento	NF	NB
Casa de vegetação (CV)	6,72 b	1,54 b
Casa de vegetação com sombrite azul (CVA)	6,61 b	1,33 b
Casa de vegetação com sombrite vermelho (CVV)	6,91 b	1,57 b
Sala de crescimento (SC)	8,74 a	1,90 a
Sala de crescimento com sombrite azul (SCA)	7,09 b	1,67 a
Sala de crescimento com sombrite vermelho (SCV)	8,31 a	1,81 a

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

De modo geral, a luz azul impede o alongamento do pecíolo, porém, aumenta a área da lâmina foliar.

Resultados semelhantes foram obtidos por Dignart (2006), em *Cattleya walkeriana*. A utilização de 20 g L⁻¹ de sacarose proporcionou maior número de folhas em plântulas híbridas de *Phalaenopsis* (Bhattacharjee et al., 1999). Para a espécie *Dendranthema grandiflora* cv. Rage, Tavares (2006) obteve maior número de folhas com a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, com média de 23,37 folhas. As diferentes respostas observadas por estes autores e neste trabalho podem ser atribuídas às diferenças intrínsecas das espécies estudadas.

Para cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* em diferentes ambientes, Dignart (2006) observou que o número de folhas em sala de crescimento foi maior que em casa de vegetação e que as malhas coloridas não resultaram em diferenças significativas para esta variável.

Melhores resultados para o número de brotos (2,04) foram obtidos com a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 4).

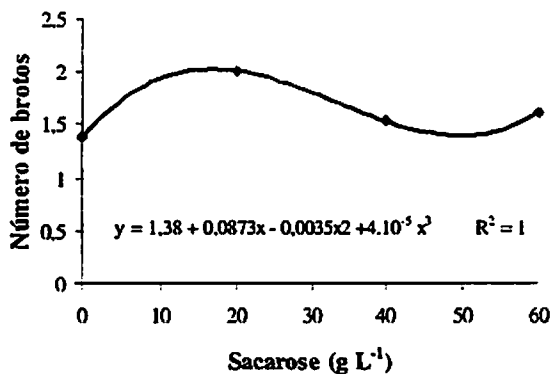


Figura 4 Número de brotos formados em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

O cultivo em sala de crescimento, independente da utilização de malhas coloridas, proporcionou maior número de brotos (Tabela 3). Esses resultados concordam com aqueles observados por Dignart (2006), para *Cattleya walkeriana*.

Dignart (2006) e Tavares (2006) não observaram diferenças significativas em qualquer concentração de sacarose adicionada ao meio para número de brotos em *C. walkeriana* e crisântemo (*Dendranthema grandiflora* cv. Rage), respectivamente; contudo, quando este carboidrato foi omitido do meio, a brotação das plântulas foi prejudicada.

O maior comprimento da parte aérea (3,0 cm) foi verificado com, aproximadamente, 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 5) e cultivo sob condições de sala de crescimento (SC). O cultivo em sala de crescimento sob malha vermelha (SCV) também foi significativo (2,25 cm), combinado com 27 g L⁻¹ de sacarose, mas com resultados inferiores ao cultivo em sala de crescimento (SC).

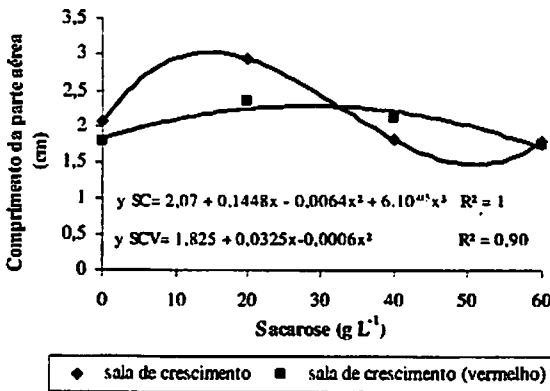


Figura 5 Comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM e mantidas sob diferentes ambientes e concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

De modo geral, comprimentos de onda mais longos, principalmente na luz vermelha, promovem acentuado alongamento nas células, enquanto que as luzes azul e branca previnem o alongamento.

Dignart (2006) e Tavares (2006) obtiveram os mesmos resultados, trabalhando com orquídea *Cattleya walkeriana* e crisântemo, respectivamente, constatando que 15 g L⁻¹ de sacarose foi a concentração que resultou no maior comprimento de parte aérea. Fráguas et al. (2004) reportaram que um meio de cultura contendo 20 g L⁻¹ de sacarose foi eficiente no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*. Ao contrário, Oliveira et al. (2003) obtiveram melhores respostas para altura de parte aérea em plântulas de *Oncidium varicosum*, com a utilização de 60 g L⁻¹ de sacarose.

Para a condição de incubação, os resultados diferem daqueles encontrados por Dignart (2006), que obteve maior comprimento de parte aérea no cultivo de *Cattleya walkeriana*, em sala de crescimento, sob telas azul e vermelha (2,65 e 2,45, respectivamente).

Radman et al. (2001) constataram maior taxa de crescimento de *Gypsophila* no tratamento com menor intensidade luminosa e explicam que o maior crescimento dos brotos pode ser resultado do processo de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente nas salas de crescimento, ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos.

Maior número de raízes (2,87 raízes) foi registrado com a adição de 45 g L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura (Figura 6).

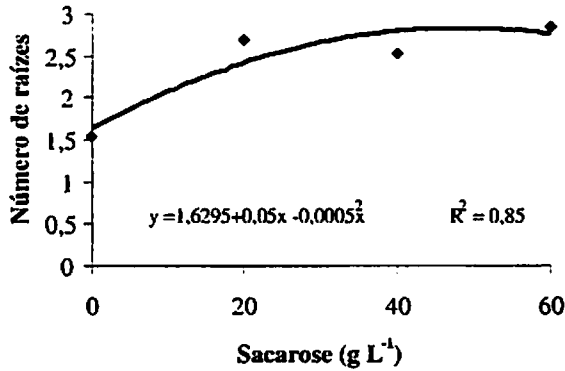


Figura 6 Número de raízes em plântulas de *Catleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

Os resultados obtidos mostram que o desenvolvimento radicular desta espécie está diretamente relacionado à concentração de sacarose no meio de cultura e estão de acordo com os encontrados por Chong & Pua (1985) e Shibli et al. (1992), que observaram a necessidade de fornecimento de alta concentração de sacarose para a emissão de raízes em várias espécies.

Resultados similares foram obtidos por Dignart (2006), que também observou que o número de raízes foi menor para as menores concentrações de sacarose no meio de cultivo *in vitro* de orquídeas (*Catleya*), porém, a sacarose não influenciou no comprimento das mesmas. Oliveira et al. (2003) registraram melhores respostas para número de raízes em plântulas de *Oncidium varicosum*, com a utilização de 60 g L⁻¹ de sacarose.

No presente trabalho, o fator qualidade de luz não teve influência sobre o número de raízes. Dignart (2006) observou respostas similares em todos os tratamentos, exceto sala de crescimento sob sombrite azul, com média inferior (2,71 raízes) no cultivo *in vitro* de *Catleya walkeriana*.

Para o comprimento de raízes, houve interação dos fatores estudados. Pelo teste F, observou-se significância entre as concentrações de sacarose e o cultivo em sala de crescimento, sala de crescimento sob malhas azul e vermelha e casa de vegetação com malha azul.

Melhores resultados (2,52 cm) foram obtidos com a utilização de 45 g L⁻¹ de sacarose e cultivo sob sala de crescimento com malha vermelha, seguido do cultivo em sala de crescimento com 60 g L⁻¹ de sacarose, com 2,43 cm de comprimento (Figura 7). Os demais tratamentos proporcionaram respostas inferiores.

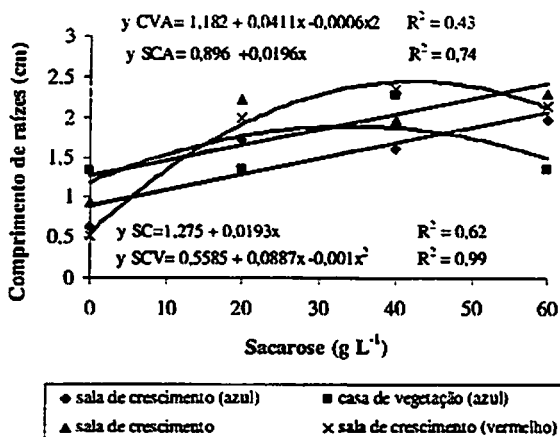


Figura 7 Comprimento de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, sob diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

Estes resultados foram contrários aos observados por Dignart (2006), que não verificou diferenças significativas entre os tratamentos de qualidade de luz para esta variável e também registrou que a sacarose não influenciou o comprimento das raízes. Faria et al. (2004) observaram que o acréscimo de sacarose no meio de cultura não influenciou o enraizamento.

Melhor crescimento do sistema radicular de plântulas de *Bletilla striata* (Orchidaceae) foi obtido com 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (Cho & Ahn, 2000). Os mesmos autores também verificaram que não houve desenvolvimento do sistema radicular na ausência de sacarose, evidenciando a essencialidade dessa fonte de carbono no meio de cultura para orquídeas. Oliveira et al. (2003) registraram melhores respostas para comprimento da maior raiz em plântulas de *Oncidium varicosum*, com a utilização de 60 g L⁻¹ de sacarose.

A intensidade luminosa pode aumentar a taxa de enraizamento e a qualidade das raízes. Em alguns casos, é necessário manter os explantes por algum tempo no escuro, para promover a indução de raízes. Portanto, a resposta ao fator luz depende da espécie em estudo. Plântulas de orquídeas são, por sua própria constituição, de fácil enraizamento, não necessitando de uma fase específica na micropropagação, como ocorre para a maioria das espécies cultivadas por meio desta técnica.

A maior massa seca de plântulas (0,034 g) foi obtida com a adição de 45 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura WPM (Figura 8).

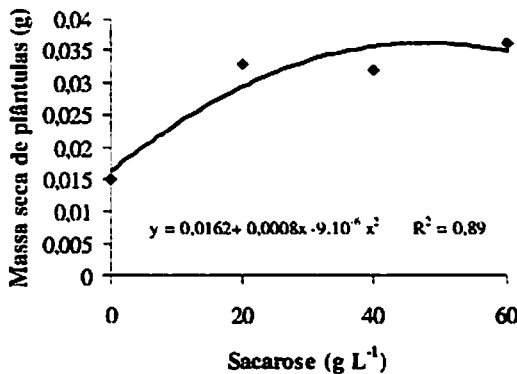


Figura 8 Massa seca de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose. Lavras, MG. 2007.

A redução de sacarose tem sido testada em diversas pesquisas como forma de melhorar a capacidade fotossintética dos tecidos cultivados *in vitro* e reduzir perdas atribuídas à contaminação microbiana. No entanto, diversos autores são contrários à idéia de redução de sacarose durante a micropropagação e afirmam que os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização não são muito claros. Portanto, manter os níveis de sacarose em torno de 2%-3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois, desse modo, a planta acumularia reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente (Capellades et al., 1990; Wainwright & Scrace, 1989).

As concentrações mais apropriadas de sacarose que devem ser adicionadas ao meio de cultivo variam com a espécie a ser cultivada, com o ambiente no qual serão mantidos os frascos e com o estágio da micropropagação (Dignart, 2006).

Neste trabalho, melhores resultados para parte aérea de plântulas (número de folhas, número de brotos e comprimento de parte aérea) foram obtidos em sala de crescimento, com a utilização de 15 g L⁻¹ de sacarose. O sistema radicular e a massa seca de plântulas foram mais responsivos em meio com 45 g L⁻¹ de sacarose, e o cultivo em SCV proporciona maior comprimento de raízes.

4 CONCLUSÕES

Melhor crescimento *in vitro* em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' são obtidos com a utilização de 15 g L⁻¹ de sacarose e cultivo em sala de crescimento convencional. Maiores enraizamento e massa seca de plântulas são obtidos com a adição de 45 g L⁻¹ de sacarose no meio, independente do ambiente

de cultivo. Para o crescimento, de raízes recomenda-se cultivo sob sombrite vermelho em sala de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS. v. 31, n. 3, p. 393-400, maio/jun. 2001.

BHATTARCHARJEE, S.; KHAN, H. A.; REDDY, P. V. Effect of various sucrose levels on *in vitro* seed germination of *Phalaenopsis* hybrid. **Journal of Hill Research**, v. 12, n. 1, p. 58-60, 1999.

CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment Influences Anatomy of Stomata and Epidermal Cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CHO, K. H.; AHN, Y. H. Effect of sucrose and supplementary substances on the germination ecology and the seedling growth of native *Bletilla striata*. **Korean Journal of Environment and Ecology**, Sowon, v. 14, p. 205-211, 2000.

CHONG, C.; PUA, E. C. Carbon nutrition of Ottawa three apple rootstocks during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 60, n. 3, p. 285-290, July 1985.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas**. 2006. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ERIG, A. C.; SCHUCH M. W. Tipo de luz na micropropagação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 27, n. 3, p. 488-490, dez. 2005.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 780-783, dez. 2004.

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. 225-258.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V, PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726, nov./dez. 2004.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MULEO, R.; MORINI, S.; CASANO, S. Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. **In vitro Cellular Development Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 5, p. 609-617, Sept./Oct. 2001.

OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidratos no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 197 p. (Curso de pós-graduação *Lato sensu* à distância: Cultura de tecidos Vegetais: Tecnologias e Aplicações).

PRAKASH, S.; HOQUE, M. I; BRINKS, T. Culture media and containers. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004. p. 29-40.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, jul./set. 2001.

SHIBLI, R. A.; SMITH, M. A. L.; SPOMER, L. A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars to osmotic stress induced *in vitro*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, n. 9, p. 1373-1381, 1992.

TAVARES, F. B. Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiology*, Kyoto, v. 19, n. 4, p. 691-699, 1978.

ARTIGO 4

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FITOTÉCNICAS DE PLÂNTULAS DE *Cattleya loddigesii* 'Tipo' SUBMETIDAS A DIFERENTES QUALIDADES DE RADIAÇÃO

Aparecida Gomes de Araújo¹, Moacir Pasqual¹, Luzia Yuriko Miyata¹,
Evaristo Mauro de Castro²

¹ Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

E-mail: agaraujo2003@hotmail.com; mpasqual@ufla.br

² Departamento de Biologia (DBI), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000.

Preparado de acordo com as normas da Revista Interciencia

RESUMO

ARAÚJO, Aparecida Gomes de. **Características anatômicas e fitotécnicas de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' submetidas a diferentes qualidades de radiação.** 2007. p. 52-74. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A qualidade de luz pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores de luz, principalmente na região do vermelho e azul. O objetivo do presente estudo foi verificar alterações anatômicas foliar e características fitotécnicas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', cultivadas *in vitro*, sob diferentes malhas coloridas com nível de radiação de 50% de sombreamento. Plântulas oriundas de autofecundação e sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em meio WPM e submetidas a diferentes condições de incubação. Testou-se o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre os frascos cultivados em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC), além dos tratamentos, nos dois ambientes, sem utilização das telas coloridas. A avaliação foi efetuada 180 dias após inoculação. Com os resultados obtidos, observou-se que o ambiente de cultivo promove alterações anatômicas e fitotécnicas em *Cattleya loddigesii* 'Tipo', durante o cultivo *in vitro*. O cultivo em casa de vegetação (luz natural) promove uma superfície foliar anatomicamente adaptada à fase de aclimatização.

Palavras-chave: qualidade de luz, anatomia foliar, malhas fotoconversoras, micropropagação, *Cattleya*.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Orientador); Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

ARAUJO, Aparecida Gomes de. **Anatomical and vegetative characteristics in *Cattleya loddigesii* 'Tipo' plantlets submitted to different light radiation.** 2007. p. 52-74. Thesis (Doctorate in Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The light quality is responsible for the morphogenesis in plants. It is mediated by a series of processes involving light receptors, mainly in the red blue region. The aim of this research work was to observe the anatomical leaf alterations as well as the vegetative characteristics of *in vitro* cultured *Cattleya loddigesii* 'Tipo'. Two different colour shading nets (red and blue, 50% mesh) were tested and compared with a control without the shading nets in greenhouse and growth room. Plantlets of 1.0 cm in length with roots produced by self pollinization of its flowers and by seeds *in vitro* germination, were inoculated in WPM medium and submitted to these different incubation environments. After 180 days of inoculation the plantlets were evaluated. It was observed that the culture environment promote anatomical and vegetative alterations in *Cattleya loddigesii* 'Tipo' during *in vitro* culture. Cultivation of the *in vitro* explants inside a greenhouse (natural light) promoted a leaf surface structure anatomically adapted to the acclimatization phase.

Key words: Light quality, leaf anatomy, photoconversor meshes, micropropagation, *Cattleya*.

* Guidance committee: Dr. Moacir Pasqual - UFLA (Adviser); Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co- adviser).

1 INTRODUÇÃO

A utilização da luz natural apresenta inúmeras vantagens sobre sistema de iluminação tradicional, no que se refere às alterações morfofisiológicas das plantas. Entre elas, destacam-se: aumento no crescimento das plântulas micropropagadas, melhoria das características fisiológicas, pelo fato das condições ambientais de cultivo serem mais semelhantes às naturais de desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, ocorrência de redução do estresse da planta durante o transplântio para ambiente *ex vitro* (Erig & Schuch, 2005).

A luz pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar certas características, tais como espessura da folha, diferenciação do mesófilo, desenvolvimento vascular, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lee et al., 1988). Baixa irradiância pode ocasionar diferentes configurações de estômatos que apresentam reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito da qualidade de luz no crescimento e desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto, sabe-se que pigmentos distintos absorvem radiação em comprimentos de onda específicos, desencadeando nos vegetais uma série de respostas moduladas por eles, tais como alterações na anatomia e diferenciação de tecidos, alongamento de plantas, enverdecimento, desenvolvimento do aparato fotossintético, incluindo síntese de pigmentos e desenvolvimento de cloroplastídeos; acúmulo de carboidrato nas folhas, alteração nas concentrações de hormônios vegetais, principalmente auxinas e giberelinas, e inibição ou estímulo de brotações axilares (Dignart, 2006).

Para o desenvolvimento *in vitro* de brotos de ameixeira (*Prunus* sp.), Muleo et al. (2001) demonstraram que, enquanto o uso de luz azul aumentou o

número de brotos axilares produzidos a partir do meristema apical, a luz vermelha promoveu crescimento. Dignart (2006) testando sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre frascos de *Cattleya walkeriana* cultivados *in vitro* em casa de vegetação e sala de crescimento, verificou que o cultivo em casa de vegetação sob sombrite azul resultou em maior número de brotos. Em sala de crescimento, a intensidade de luz incidente foi muito baixa, prejudicando o desenvolvimento da cultura.

Embora diversos autores tenham confirmado efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade de luz nas plantas, as respostas variam de acordo com a espécie estudada (Antonopolou et al., 2004; Schuerger et al., 1997). A qualidade da luz pode afetar estruturas anatômicas das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, fazendo com que as plantas exibam um alto grau de plasticidade fisiológica e anatômica para mudanças na qualidade de luz (Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997).

Diante disso, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o efeito de qualidades de luz com uso de malhas coloridas nas características fitotécnicas e na anatomia foliar em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' (Orchidaceae).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Tipo' oriundas de autopolinização e sementes germinadas *in vitro* com, aproximadamente, 1,0 cm de comprimento e com raízes foram inoculadas em frascos contendo o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), acrescido de carvão ativado (2 g L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹), ágar (6 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Os explantes, em número de 5 por frasco, foram inoculados em recipientes com capacidade de 250 cm³, contendo 60 mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas e filme plástico, e, em seguida, transferidos para sala de crescimento ou casa de vegetação, com nível de sombreamento de 50% de transmitância.

Os tratamentos consistiram de diferentes ambientes de cultivo *in vitro*: casa de vegetação (CV), casa de vegetação com sombrite de malha azul (CVA), casa de vegetação com sombrite de malha vermelha (CVV), sala de crescimento (SC), sala de crescimento com sombrite de malha azul (SCA) e sala de crescimento com sombrite de malha vermelha (SCV).

O material foi colocado diretamente sobre as bancadas em casa de vegetação e sob malhas especiais que, segundo o fabricante, alteram o espectro de luz solar. As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries®. Utilizou-se a malha ChromatiNet Vermelha 50%, produzida com a finalidade de alterar espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. Outro tratamento foi feito com a malha ChromatiNet Azul 50% que, segundo o fabricante, muda o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescentando as ondas azuis.

Foram cultivadas também plântulas em frascos mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com radiação de $5,52 \text{ W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes, para servirem como tratamento controle. Em sala de crescimento, foram testadas também as coberturas coloridas CromatiNet vermelha e azul.

A intensidade da radiação (Tabela 1) foi mensurada por meio de sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

Tabela 1 Radiação média ($\text{MJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) observada nos microambientes em casa de vegetação e sala de crescimento. Lavras, MG. 2007.

Ambiente	Radiação	Ambiente	Radiação
CV	3,15	SC	3,33
CVV	2,31	SCV	1,30
CVA	3,15	SCA	1,61

CV: casa de vegetação; CVV: casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA: casa de vegetação com sombrite azul; SC: sala de crescimento; SCV: sala de crescimento com sombrite vermelho; SCA: sala de crescimento com sombrite azul.

Características fitotécnicas

As avaliações fitotécnicas foram realizadas por meio dos seguintes parâmetros: número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento de parte aérea em cm (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raiz, em cm (CMR) e massa seca de plântulas, em g (MSP), para *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivada em diferentes ambientes de luz com telas coloridas.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando seis tratamentos, com oito repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo cinco plântulas.

Aos 180 dias de cultivo, as plântulas foram coletadas para proceder-se à coleta de dados. Para a realização das análises de variância, foi utilizado o programa Sisvar (Ferreira, 2000). As médias foram comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Características anatômicas

Cinco plântulas foram retiradas por tratamento aleatoriamente e fixadas em álcool etílico 70%, para análise dos estudos anatômicos. Este trabalho foi realizado no laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para as seções transversais, foram realizados cortes na região do terço mediano das folhas, utilizando-se o micrótomo de mesa. As seções transversais

foram clarificadas em hipoclorito de sódio 1%, durante cinco minutos, sendo enxaguadas em água destilada por dez minutos. Após a lavagem, as seções foram coradas com azul de astra e safranina, seguindo a metodologia descrita por Bukatsch (1972), modificada por Kraus & Arduin (1997). As lâminas foram montadas em glicerina 50%. Para cada tratamento, foram avaliadas cinco folhas de diferentes plântulas e, em cada folha, foram efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. Utilizou-se uma ocular micrometrada acoplada a um microscópio de luz. As variáveis analisadas para as seções transversais foram: espessura das epidermes nas faces superior e inferior, espessura do mesofilo do feixe central e número de feixes vasculares.

Os cortes paradérmicos foram efetuados manualmente no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. As lâminas das seções paradérmicas foram montadas com corante safranina em glicerina, com concentração de 0,1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram: frequência de estômatos, número das células epidérmicas, diâmetros polar e equatorial.

A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961). A frequência estomática e o número de células foram calculados pela contagem do número por mm^2 de área da folha.

As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Anatomia Vegetal Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se um microscópio Olympus modelo BX 60, acoplado a uma máquina fotográfica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características fitotécnicas

Houve efeito significativo das diferentes qualidades de luz utilizadas para todas variáveis fitotécnicas estudadas, exceto para número de raízes, que teve comportamento igual em todos os tratamentos aplicados (Tabela 2).

Tabela 2 Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e massa seca de plântulas (MSP) em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', cultivadas em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MSP
Luz	5	83,8880**	13,0247**	3,9983**	4,4764 ^{ns}	3,6949*	0,0029**
Repetição	7	29,4525 ^{ns}	5,9764 ^{ns}	0,3175 ^{ns}	2,7418 ^{ns}	2,0259 ^{ns}	0,0012 ^{ns}
Resíduo	35	18,0807	3,3828	0,1938	2,6700	1,2973	0,0010
CV (%)		33,74	49,58	18,51	37,77	26,92	44,93

** , * significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns- não significativo

O número de folhas observado em sala de crescimento (SC) foi maior que em casa de vegetação (CV). Diferentes coberturas coloridas para ambientes similares (sala de crescimento ou casa de vegetação) não resultaram em diferenças significativas para esta variável (Tabela 3).

Silva & Debergh (1997) também não observaram diferença quando trabalharam com alteração de qualidade espectral em ambiente de cultivo *in vitro* de *Azorina vidalli*. Em *Cattleya walkeriana*, Dignart (2006) observou resultados semelhantes para número de folhas.

Tabela 3 Médias para número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento de parte aérea em cm (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raiz, em cm (CR) e massa seca de plântulas, em g (MSP), para *Cantleya loddigesii* 'Tipo', cultivada em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. Lavras, MG, 2007.

Trat	NF	NB	CPA	NR	CR	MSP
CVV	9,37 b	1,91 b	2,06 b	4,83 a	4,44 a	0,0625 b
CVA	9,05 b	2,74 b	1,90 b	4,58 a	4,41 a	0,0737 b
CV	11,30 b	4,49 a	1,36 c	5,11 a	4,62 a	0,0650 b
SCV	13,30 a	3,41 b	2,83 a	3,42 a	3,36 b	0,0475 b
SCA	16,29 a	4,26 a	3,10 a	3,35 a	3,46 b	0,0637 b
SC	16,29 a	5,44 a	3,02 a	4,65 a	5,09 a	0,105 a
CV(%)	33,74	49,58	18,51	37,77	26,92	44,93

* Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Os valores obtidos para comprimento de parte aérea foram maiores em sala de crescimento (SC), SCA e SCV (Tabela 3), concordando com os obtidos por Dignart (2006), em *Cattleya walkeriana*. Esse resultado pode ser o reflexo de um crescimento já com características de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente em sala crescimento. Esse aspecto já foi relatado por Radmann et al. (2001), no cultivo de *Gypsophila paniculata*, em que todas as plântulas mantidas em casa de vegetação desenvolveram um menor comprimento de parte aérea, comparadas às plântulas mantidas em sala de crescimento.

No presente estudo, em casa de vegetação, observaram-se menores comprimentos de parte aérea, sendo essas plântulas, contudo, mais rígidas que as obtidas em sala de crescimento, principalmente sob as telas vermelha e azul.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para número de raízes. Para comprimento médio de raízes, todos os tratamentos foram similares, exceto sala de crescimento com sombrites azul e vermelho, que resultaram em médias inferiores (Tabela 3). No enraizamento de *Pinus silvestris* cultivados *in vitro*, Niemi et al. (2005) não registraram diferenças, sob espectros de luz diferenciados. Antonopolou et al. (2004) encontraram melhores taxas nos

isso porque esse tipo de radiação contém todos os comprimentos de onda necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos. Morini et al. (2000) também encontraram maior taxa de regeneração de raízes por explante foliar de *Cydonia oblonga* em amplo espectro, ou seja, sob radiação de cor branca.

Os maiores números de brotações foram obtidos em sala de crescimento, não diferindo significativamente entre sala de crescimento com sombrite azul e casa de vegetação sem cobertura. A formação de brotos axilares pode ser o resultado da liberação da dominância apical, tanto pela fotoxidação de auxinas em altas intensidades de luz como pela degradação desse regulador em luz azul (Chee & Pool, 1989). Os tratamentos que resultaram em menor número de brotações foram casa de vegetação e sala de crescimento com cobertura vermelha e casa de vegetação com sombrite azul (Tabela 3).

Maior massa seca de plântulas foi verificada em sala de crescimento sem sombrites coloridos. Os demais tratamentos tiveram resultados semelhantes, porém, inferiores à sala de crescimento (Tabela 3).

Kodym & Zapata-Arias (1999) afirmam que, além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Conseqüentemente, haverá um maior peso final nas plântulas.

Características anatômicas

Constatou-se que as folhas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas sob diferentes espectros de luz são do tipo hipostomáticas, apresentando estômatos do tipo anomocítico (Figura 3). Em folhas de *C. walkeriana* cultivadas *in vitro*, Dignart (2006) verificou que estas são hipostomática, sendo observados estômatos dos tipos anomocítico, tetracítico e ciclocítico.

Neste estudo, observou-se que as epidermes de *Cattleya loddigesii* são uniestratificadas em ambas as faces da folha e o mesofilo possui parênquima clorofiliano homogêneo (Figura 4). Tais resultados são divergentes dos apresentados por Zanenga-Godoy & Costa (2003) para quatro espécies do gênero *Cattleya*, em cultivo *in vivo*, que relatam, ainda, que o mesofilo é do tipo bifacial compacto, com presença de hipoderme. Entretanto, Dignart (2006) registrou mesofilo com parênquima clorofiliano e células de formato semelhante e epiderme adaxial mais espessa que a abaxial, em *C. walkeriana*.

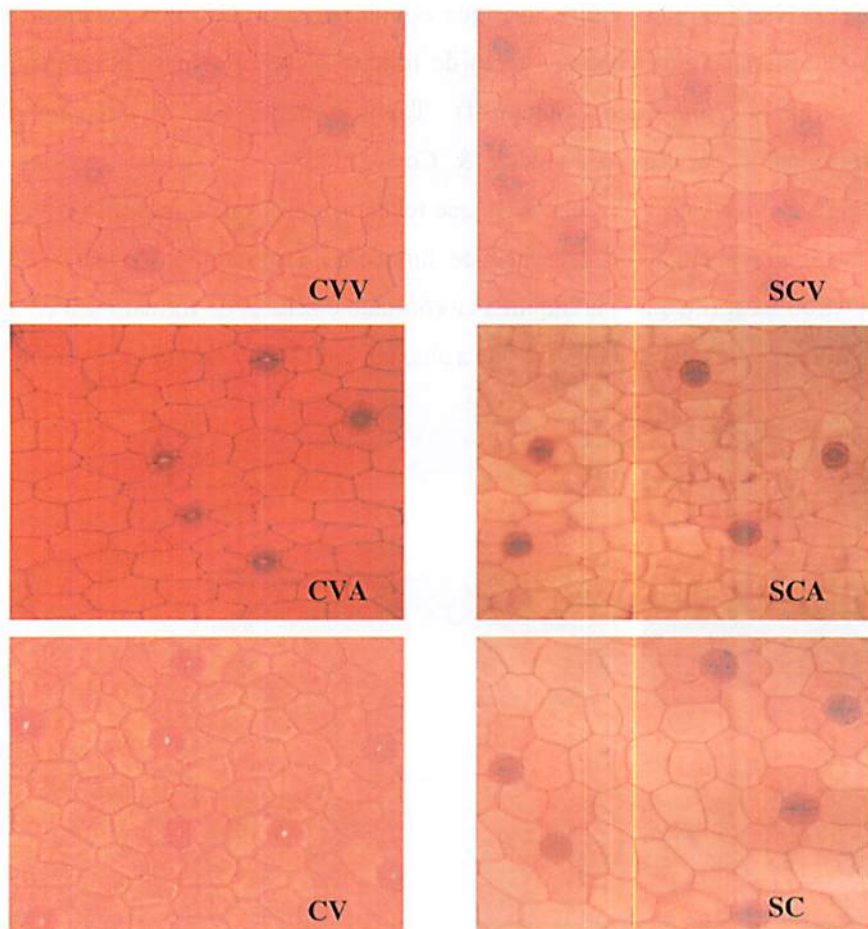


Figura 3: Seções paradérmicas na superfície abaxial de folhas de *C. loddigesii*. 'Tipo'. CV= casa de vegetação; CVV=casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA=casa de vegetação com sombrite azul; SC=sala de crescimento; SCV=sala de crescimento com sombrite vermelho; SCA=sala de crescimento com sombrite azul. Lavras, MG. 2007.

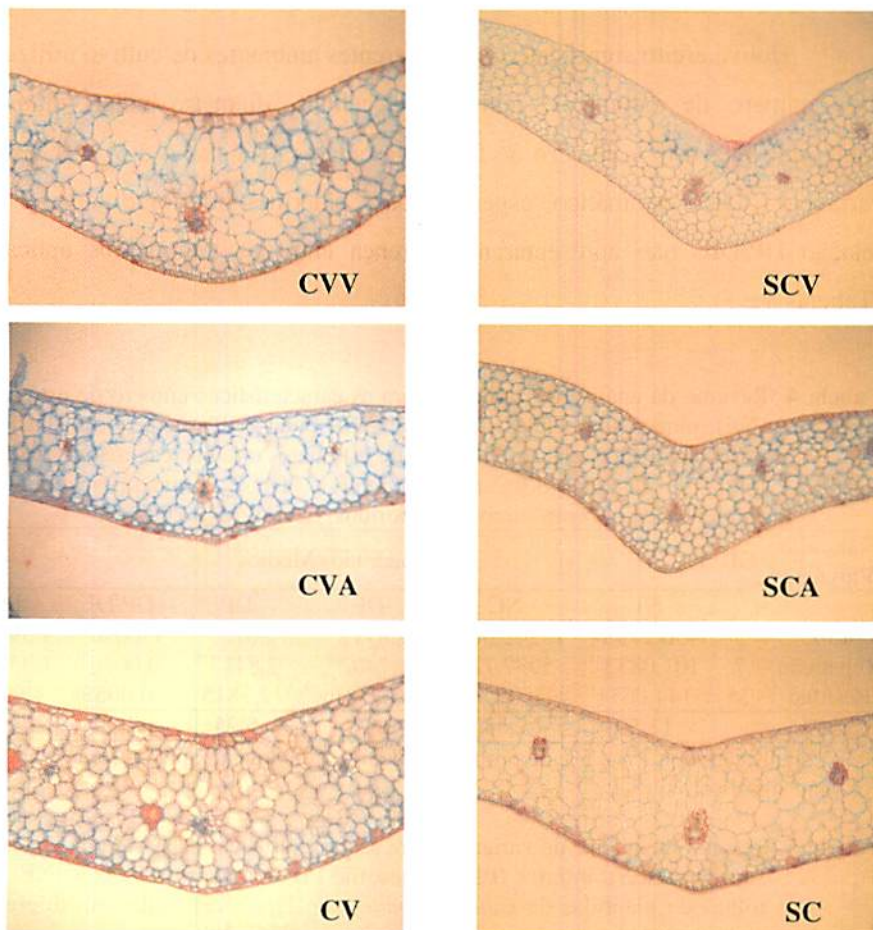


Figura 4 Seções transversais de folhas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro*. CV= casa de vegetação; CVV=casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA=casa de vegetação com sombrite azul; SC=sala de crescimento; SCV=sala de crescimento com sombrite vermelho; SCA=sala de crescimento com sombrite azul. Lavras, MG. 2007.

Houve efeito significativo dos diferentes ambientes de cultivo utilizados para número de estômatos, número de células, diâmetro polar, diâmetro equatorial, mesofilo e número de feixes vasculares (Tabelas 4 e 5). As demais variáveis (índice estomático, espessura das epidermes inferior e superior e a relação DP/DE) não apresentaram diferença entre os tratamentos aplicados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 Resumo da análise de variância para as características número de estômatos (NE), número de células (NC), diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos (μm), relação DP/DE entre estômatos e índice estomático (IE), em folhas de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', cultivada em diferentes ambientes de luz com sombrites coloridos. Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NE	NC	DE	DP	DP/DE	IE
Luz	5	456,2798*	15242,00**	22,8792**	10,6773**	0,0096 ^{ns}	1,5957 ^{ns}
Repetição	7	101,0833 ^{ns}	5997,72 ^{ns}	4,7402 ^{ns}	2,8417 ^{ns}	0,0076 ^{ns}	1,3591 ^{ns}
Resíduo	35	144,0671	3502,99	3,3381	2,3815	0,0052	1,9336
CV (%)		13,59	7,48	6,28	5,25	7,09	13,79

**, * significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns- não significativo

Tabela 5 Resumo da análise de variância para as características espessura da epiderme superior (EES), inferior (EEI) e mesofilo (M) e número de feixes (NF), em folhas de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', cultivadas em diferentes ambientes de luz sombrites coloridos. Lavras, MG. 2007.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		EES	M	EEI	NF
Luz	5	0,9841 ^{ns}	472,2365**	0,0445 ^{ns}	46,3533**
Repetição	7	0,7155 ^{ns}	37,9215 ^{ns}	0,0270 ^{ns}	0,8667 ^{ns}
Resíduo	35	0,5049	80,0952	0,0918	1,4867
CV (%)		14,76	16,23	16,42	16,55

**, * significativo, a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns- não significativo

Maior número de estômatos foi observado em plantas cultivadas em sala de crescimento sem sombrite e com cobertura vermelha, e em casa de vegetação sem cobertura e com sombrite vermelho (Tabela 6). Enquanto que plântulas

cultivadas sob cobertura azul, tanto em casa de vegetação como em sala de crescimento, tiveram resultados inferiores. Esses resultados podem ser comparados aos observados por Rajapske & Kelly (1993), que obtiveram menor densidade estomática trabalhando também com crisântemo cultivado sob filtros de CuSO_4 , que produz os mesmos efeitos de filtros de luz azul.

Tabela 6 Número de estômatos (NE), número de células (NC), diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos (μm), espessura da epiderme superior (EES), inferior (EEI) e mesofilo (M), número de feixes (NF), relação DP/DE entre estômatos e índice estomático em folhas de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', cultivadas em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. Lavras, MG. 2007.

Trat	NE	NC	DE	DP	EES	M	EEI	NF	DP/DE	IE
CVV	93,7 a	808,8 a	31,1 a	30,4 a	45,0 a	697 a	18 a	6,0 b	0,98 a	10,4 a
CVA	80,4 b	754,1 b	29,9 a	30,5 a	54,9 a	439 b	18 a	5,2 b	1,02 a	10,2 a
CV	93,1 a	842,9 a	30,6 a	30,9 a	44,1a	629 a	19a	7,0 b	1,01 a	9,92 a
SCV	95,4 a	767,8 b	25,8 b	28,3 b	52,2 a	484 b	19 a	7,0 b	1,10a	10,8 a
SCA	72,5 b	714,3 b	30,0 a	29,2 b	45,0 a	500 b	17,1 a	5,6 b	0,98 a	9,17 a
SC	94,7 a	857,7 a	26,9b	27,1 b	47,7 a	559 b	19,8 a	13,4 a	1,01 a	9,97 a
CV(%)	13,59	7,48	6,28	5,25	14,76	16,23	16,42	16,55	7,09	13,79

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Dignart (2006) registrou maiores densidades de estômatos, em *Cattleya walkeriana*, em sala de crescimento sem sombrite e com cobertura vermelha, e em casa de vegetação sem cobertura e menores densidades em plântulas cultivadas sob cobertura azul, tanto em casa de vegetação como em sala de crescimento. Para crisântemo (*Dendranthema grandiflora* cv. Rage), Tavares (2006) observou maiores densidades de estômatos em casa de vegetação, seguida de casa de vegetação com sombrite vermelho, que não diferiram entre si, estatisticamente. As menores densidades foram verificadas em sala de crescimento, casa de vegetação com sombrite azul e preto.

Contudo, sabe-se que a análise da densidade estomática, por si só, não é um parâmetro preciso para afirmar a adaptabilidade anatômica de espécies cultivadas *in vitro* à aclimatização (Rocha, 2005). Um bom indicativo de

funcionalidade estomática é o formato das células guarda em conjunto e um bom parâmetro de avaliação é a relação entre diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos. De acordo com Khan et al. (2002), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada, freqüentemente, é associada a estômatos que não apresentam funcionamento normal. Segundo Rocha (2005), quanto maior for a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE), mais elipsóide é o formato do estômato, portanto, maior funcionalidade ele deve apresentar.

Quanto aos diâmetros polar e equatorial, foram observados melhores resultados nos tratamentos de casa de vegetação com e sem proteção, não diferindo entre si significativamente; o tratamento sob luz artificial (SC) apresentou resultado semelhante aos tratamentos anteriormente citados para o diâmetro equatorial (Tabela 6). Dignart (2006) observou que o cultivo em casa de vegetação com sombrite vermelho mostrou-se mais eficiente, quanto aos diâmetros polar e equatorial, em estômatos de folhas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro*. Tavares (2006) registrou melhores respostas quanto aos diâmetros polar e equatorial, em crisântemo, nos tratamentos de casa de vegetação e CV com telas coloridas, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Maior número de células foi registrado quando as plântulas foram cultivadas em sala de crescimento sem sombrite, casa de vegetação sem proteção e com sombrite vermelho (Tabela 6).

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para espessura das epidermes superior e inferior; já a espessura do mesofilo foi maior em casa de vegetação sem sombrite e com sombrite vermelho; os demais tratamentos tiveram resultados inferiores (Tabela 6). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Schuerger et al. (1997), que também não observaram diferenças significativas para espessura das epidermes

em pimentão (*Capsicum annum*) e afirmaram que o mesofilo é mais eficiente nas respostas de alterações espectrais.

Lee et al. (1988) atribuíram a altas intensidades de luz o aumento no tamanho das células do mesofilo, a maior espessura da folha, bem como a compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar*. Os autores afirmam, ainda, que baixas intensidades luminosas reduzem a divisão celular, resultando em reduzida área foliar, produzindo folhas mais delgadas.

Os resultados encontrados para a espessura do mesofilo evidenciam a importância da influência da intensidade de luz sobre as características desse tecido foliar, como já relatado por diversos autores (Deccetti, 2004; Rocha, 2005; Serret et al., 1997). E diferem de outros obtidos por tratamentos de alterações espectrais, pois, na maioria dos casos, observa-se redução da espessura foliar sob radiação vermelha (Cui et al., 1991; Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997). Quanto maior o espessamento do mesofilo, maior a eficiência da fotossíntese, entretanto, exposição a elevadas densidades de fluxo de fótons fotossintéticos pode levar a danos por fotoinibição e fotoxidação do aparato fotossintético.

O número de feixes vasculares foi maior em plântulas cultivadas em sala de crescimento sem utilização das malhas coloridas (Tabela 6). Os tratamentos em sala de crescimento com sombrites e os de casa de vegetação, independente da cobertura com sombrites coloridos, tiveram resultados inferiores.

Analisando-se a relação DP/DE (Tabela 6), artifício utilizado para se medir a funcionalidade estomática, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Diante disso, conclui-se que a condição de luz natural (CV sem proteção) é capaz de proporcionar elevada densidade estomática, com boa funcionalidade dos estômatos, contribuindo para que as plântulas sejam mais facilmente adaptadas à condição heterotrófica. De forma

- 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. 225-258.
- KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198 p.
- LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, M. I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-252, jun. 1961.
- LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum Flux Density Effects on the anatomy and Surface Morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves, **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MORINI, S.; D'ONOFRIO, C. D.; BELLOCCHI, G.; FISICHELLA, M. Effects of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 47-55, 2000.
- MULEO, R.; MORINI, S.; CASANO, S. Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. **In vitro Cellular Development Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 5, p. 609-617, Sept./Oct. 2001.

NIEMI, K.; JULKUNEN-TITTO, R.; TEGELBERG, R.; HAGGMAN, H. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine *in vitro*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 1, p. 123-128, Jan. 2005.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, 171-175, jul./set. 2001.

RAJAPSKE, N. C.; KELLY, J. W. Spectral filters influence transpirational water loss in *Chrysanthemum*. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 999-1001, Oct. 1993.

ROCHA, H. S. Luz e sacarose na micropropagação da bananeira ‘prata anã’: alterações morfoanatômicas. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 177-185, May 1995.

SCHUERGER, A. C.; BROWN, C.; STRYJEWSKI, E. C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 273-282, Mar. 1997.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 217-230, Sept. 1997.

SILVA, M. H.; DEBERGH, P. C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 187-193, 1997.

TAVARES, F. B. Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electrom microscopy of *invitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-780, May 1983.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 101-118, jan./abr. 2003.