

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Brassavola tuberculata Hook. (ORCHIDACEAE)**

GISELE GARCIA DE SOUSA

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013**

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
Brassavola tuberculata Hook. (ORCHIDACEAE)**

GISELE GARCIA DE SOUSA
Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROFa. DRa. YARA BRITO CHAIM JARDIM ROSA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S725g	Sousa, Gisele Garcia de. Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. (ORCHIDACEAE). / Gisele Garcia de Sousa. – Dourados, MS : UFGD, 2013. 91f. Orientadora: Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Floricultura. 2. Biotecnologia. 3. Orquídea nativa. 4. Cultivo <i>in vitro</i>. I. Título. CDD – 635.9
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata*
(ORCHIDACEAE)

por

Gisele Garcia de Souza

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTORA EM AGRONOMIA

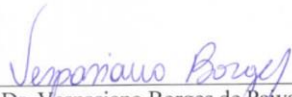
Aprovada em: **22 de Novembro de 2013**



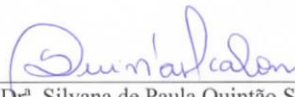
Dr. Etenaldo Felipe Santiago
UEMS



Dr. Rogério Mamoru Suzuki
Instituto de Botânica- SP



Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto
UFMS



Dr. Silvana de Paula Quintão Scalón
Co-orientadora/UFGD



Dr. Yara Brito Chaim Jardim Rosa
Orientadora – UFGD/FCA

A Deus, fonte de toda a vida,

OFEREÇO

Aos meus pais,

João Guimarães de Sousa e Ivanilda Garcia de Sousa

Aos meus filhos,

Luciano de Sousa Rós e Adriana de Sousa Rós

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas, pela força e coragem para seguir e por me confortar nas horas difíceis.

A Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, pela oportunidade concedida.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia que tornou possível a realização deste trabalho.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela gentileza e apoio.

A FUNDECT pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto e à AGRAER e à IAGRO pelo incentivo à obtenção do título de doutor.

A minha orientadora Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa pelos importantes ensinamentos tanto científicos como pessoais, pelo exemplo de dedicação, capacidade e competência, pela ajuda, paciência, amizade, estímulo, contribuindo em meu crescimento acadêmico e profissional, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon e Dr. Edgard Jardim Rosa Junior co-orientadores dessa tese, pelo incentivo à busca de maiores conhecimentos, pelos conselhos, atenção e conhecimento a mim dispensados.

As técnicas de laboratório Nilda Tiyoko Kobayashi Hoffmann, Elda Barrios de Azambuja Silva e Elaine Costa Galdeia por sua inestimável colaboração, interesse e disposição para a realização dos trabalhos.

Ao Dr. Rogério Mamoru Suzuki, Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto, Dr. Etenaldo Felipe Santiago e Dra. Rosilda Mara Mussury Franco Silva por aceitarem o convite para fazer parte da banca de defesa desta tese, e assim ter a oportunidade de compartilhar ensinamentos valiosos e certeza de melhorias neste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do doutorado, pela amizade, pelo carinho, pelo aprendizado, companheirismo e companhia essenciais durante nossa jornada.

A Dra. Benedita Maria Rodrigues Otubo, pesquisadora da Agência Estadual de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural de Mato Grosso do Sul – AGRAER, pela oportunidade de poder compartilhar seu conhecimento, e pelas sugestões na descrição desta tese.

A todos que de alguma forma participaram deste trabalho o meu muito obrigado, e que Deus conceda a cada um, o dobro de bem que me fizeram!

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I - ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS, BAP E TEMPO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. (ORCHIDACEAE)	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4. CONCLUSÃO	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO II - TIPOS DE POLINIZAÇÃO, ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS E BAP NO DESENVOLVIMENTO INICIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. (ORCHIDACEAE)	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Frutos colhidos aos 150 DAP	33
3.2. Frutos colhidos aos 180 DAP	36
3.3. Frutos colhidos aos 210 DAP	39
4. CONCLUSÃO	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO III - EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO E DO ÁGAR NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. (ORCHIDACEAE)	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÃO	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO IV – CRESCIMENTO DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MURASHIGE & SKOOG	64
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4. CONCLUSÃO	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CONCLUSÕES GERAIS	76

LISTA DE QUADROS

PÁGINA

CAPÍTULO I - ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS, BAP E TEMPO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de sementes de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., oriundas de polinização cruzada manual (GC) e polinização natural (GN), em função das concentrações de BAP, dos dias após a polinização (DAP) e do tempo de cultivo (TC)	18
--	----

CAPÍTULO II - TIPOS DE POLINIZAÇÃO, ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS E BAP NO DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância do número de protocormos (NºP) e das porcentagens de protocormos nos estádios 1 (%P1), 2 (%P2), 3 (%P3) e 4 (%P4) e de protocormos mortos (%PM) de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., em função do tipo de polinização (POL), concentrações de BAP (BAP) e dias após a polinização (DAP) . . .	32
---	----

CAPÍTULO III - EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO E DO ÁGAR NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook.	54
--	----

CAPÍTULO IV - CRESCIMENTO DE *Brassavola tuberculata* Hook. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MURASHIGE & SKOOG.

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da massa fresca de planta (MFP), porcentagem de massa fresca de parte aérea (%MFPA) e massa fresca de raiz (%MFR), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF), comprimento maior folha (CMF), número de perfilho (NP) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook	68
---	----

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

CAPÍTULO I - ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS, BAP E TEMPO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

- FIGURA 1. A) *Brassavola tuberculata* Hook em seu habitat; B) Planta de *Brassavola tuberculata* Hook.; C) detalhe da flor de *Brassavola tuberculata* Hook.; D) Frutos de *Brassavola tuberculata* Hook. (Barra = 1 cm). Dourados, UFGD, 2013 12
- FIGURA 2. Frutos de *Brassavola tuberculata* Hook., colhidos aos 120 (A), 150 (B), 180 (C) e 210 (D) dias após a polinização (DAP). Barras = 1 cm. Dourados, UFGD, 2013 16
- FIGURA 3. Porcentagem de germinação de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundas de polinização cruzada manual (GC) e polinização natural (GN), em função do tempo de cultivo 15TC(A,B), 30 TC (C,D) e 45 TC (E,F), época de maturação dos frutos (DAP) e concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013 . . 19

CAPÍTULO II - TIPOS DE POLINIZAÇÃO, ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS E BAP NO DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

- FIGURA 1. (A) Número total de protocormos (NºP), (B) Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P1), (C) porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), (D) porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), (E) porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e (F) porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 150 DAP em função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013 35
- FIGURA 2. (A) Número total de protocormos (NºP), (B) Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P), (C) porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), (D) porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), (E) porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e (F) porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 180 DAP em função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013 38
- FIGURA 3. (A) Número total de protocormos (NºP), (B) Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P), (C) porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), (D) porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), (E) porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e (F) porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 210 DAP em

	função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013	40
FIGURA 4.	Porcentagem de protocormos <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. (A) oriundos de polinização natural (PN); (B) oriundos de polinização cruzada manual em função das épocas de coleta dos frutos. Dourados, UFGD, 2013	42
FIGURA 5.	Número de protocormos de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., oriundos polinização natural e de polinização cruzada manual em função das épocas de coleta dos frutos. Dourados, UFGD, 2013 . .	43
CAPÍTULO III - EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO E DO ÁGAR NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook (ORCHIDACEAE).		
FIGURA 1.	Porcentagem de germinação de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., nos tempos de armazenamento (TA): (A) zero dias; (B) 30 dias; (C) 60 dias; (D) 90 dias, em função das concentrações de ágar. Dourados, UFGD, 2013.	55
FIGURA 2.	Porcentagem de germinação de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., nas concentrações de ágar: (A) 0 g L ⁻¹ ; (B) 1 g L ⁻¹ ; (C) 2 g L ⁻¹ ; (D) 3 g L ⁻¹ ; (E) 4 g L ⁻¹ ; (F) 5 g L ⁻¹ ; (G) 6 g L ⁻¹ ; (H) 7 g L ⁻¹ ; (I) 8 g L ⁻¹ , em função do tempo de armazenamento (TA). Dourados, UFGD, 2013	58
CAPÍTULO IV - CRESCIMENTO DE <i>Brassavola tuberculata</i> Hook. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MURASHIGE & SKOOG.		
FIGURA 1.	Características vegetais de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., em função das concentrações do meio MS. (A) porcentagem de sobrevivência (%SOB); (B) número de perfilhos (NP); (C) número de folhas (NF); (D) número de raízes (NR); (E) comprimento da maior folha (CMF); (F) comprimento da maior raiz. Dourados, UFGD, 2013	70
FIGURA 2.	Massa fresca de <i>Brassavola tuberculata</i> Hook., em função das concentrações de meio MS. (A) massa fresca da planta; (B) porcentagem de massa fresca da parte aérea; (C) porcentagem de massa fresca das raízes. Dourados, UFGD, 2013	72

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* HOOK. (ORCHIDACEAE)

RESUMO

A propagação *in vitro* de orquídeas tem sido utilizada para produção de plantas comercialmente importantes e para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, enquanto que o armazenamento de sementes de orquídeas preserva a variabilidade genética. Foram objetivos desta pesquisa 1 – estudar o efeito da concentração de 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,1; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹), da maturação dos frutos (60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização - DAP) e de três tempos de cultivo (15, 30 ou 45 dias) na germinação assimiótica de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundas de três tipos de polinização (autopolinização manual, polinização cruzada manual ou polinização natural); 2 - avaliar os estádios de desenvolvimento inicial *in vitro* de *B. tuberculata*, em resposta à utilização de 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,1; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹), da maturação dos frutos (60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização - DAP) e de três tipo de polinização (autopolinização manual, polinização cruzada manual ou polinização natural); 3 - avaliar o tempo de armazenamento e as concentrações de ágar na germinação *in vitro* de *B. tuberculata* e 4 – avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio MS, no crescimento inicial de plantas de *B. tuberculata*. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2013. Foram utilizadas para os estudos de germinação e desenvolvimento *in vitro*, sementes de *B. tuberculata* provenientes de diferentes tipos de polinização e épocas de maturação, e para o crescimento, plantas com 180 dias após a semeadura. As culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média 25±2°C, fotoperíodo de 12h, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Sendo avaliados porcentagem de germinação; número de protocormos, porcentagem de protocormos em diferentes estádios de desenvolvimento e número de protocormos mortos; porcentagem de sobrevivência, número de perfilhos e de raízes, comprimento da maior folha e da maior raiz, massa fresca da planta. Todas as variáveis e atributos vegetais foram submetidos às análises de variância e de regressão. A autopolinização manual produziu sementes que não germinaram *in vitro*, enquanto que as sementes produzidas por polinização cruzada manual ou polinização natural produziram sementes que germinaram *in vitro* quando os frutos foram colhidos após 150 DAP. Porcentagem de germinação superior a 90% foram registradas em frutos oriundos de polinização cruzada manual e polinização natural, colhidos aos 210 DAP e cultivados por período superior a 30 dias. A germinação de *B. tuberculata* está mais vinculada ao estágio de maturação dos frutos uma vez que houve pouca influência do fornecimento exógeno de citocinina sobre a sua germinação *in vitro*. O número de protocormos da polinização cruzada manual e da polinização natural é maior em frutos coletados aos 180 DAP. A porcentagem de protocormos em estágio 1(%P1) formada pela polinização cruzada manual e polinização natural é maior em frutos coletados aos 150 DAP. A porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) é maior em frutos coletados aos 150 DAP oriundos de polinização natural e, aos 210 DAP, naqueles oriundos de polinização cruzada manual. O emprego dos meios líquido e sólido favorecem a germinação de *B. tuberculata*. Sementes de *B. tuberculata* armazenadas por 90 dias apresentam germinação acima de 70%. As plantas

de *B. tuberculata* apresentam maior crescimento inicial quando cultivadas em meio MS com concentração entre 70 e 75%. A utilização do meio MS 50% é promissor quando o objetivo for a multiplicação *in vitro* de *B. tuberculata*.

Palavras Chaves: Orchidaceae, regulador de crescimento, cultivo *in vitro*, meio de cultura, armazenamento de sementes, agente geleificante, orquídeas nativas, propagação.

IN VITRO GERMINATION AND GROWTH OF *Brassavola tuberculata* HOOK. (ORCHIDACEAE)

ABSTRACT

In vitro propagation of orchids has been used for the production of commercially important plants and for the conservation of endangered species, while the storage of orchid seeds preserves genetic variability. Objectives of this research were: 1 – to study the effect of the concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.1, 1.0 or 2.0 mg L⁻¹), fruit maturation (60, 90, 120, 150, 180 or 210 days after pollination - DAP) and the three culture time (15, 30 or 45 days) in the asymbiotic seed germination of *Brassavola tuberculata*, from three types of pollination (hand self-pollination, hand cross-pollination or natural pollination); 2 - evaluate the initial *in vitro* stages of development of *B. tuberculata*, in response to the use of 6- benzylaminopurine (BAP) (0.0 , 0.1, 1.0 or 2.0 mg L⁻¹), fruit maturation (60, 90, 120, 150, 180 or 210 days after pollination - DAP) and the three types of pollination (hand self-pollination, hand cross-pollination or natural pollination); 3 - evaluate the storage time and agar concentrations *in vitro* germination of *B. tuberculata* and 4 - to evaluate the effect of different concentrations of MS medium, the initial growth of *B. tuberculata*. The research was performed at the Laboratory for *in vitro* cultivation of the Faculty of Agricultural Sciences (FCA) of the Federal University of Grande Dourados (UFGD), during the period from august 2010 to 2013. Were used for the research of germination and development *in vitro*, seeds of *B. tuberculata* from different types of pollination and ages of maturation, and for the growth, plants 180 days after sowing. The cultures were kept in a growth room at 25±2°C and photoperiod of 12h, in completely randomized design. Being evaluated germination percentage; number of protocorm, protocorm percentage at different stages of development and number of dead protocorms; survival percentage, number of tillers and roots, length of leaf and greater root mass fresh plant. Every variables and vegetal attributes were submitted to variance analysis and of the regression. The hand self-pollination produced seeds that did not germinate *in vitro*, whereas the seeds produced by hand crosspollination or natural pollination, produced seeds that germinated *in vitro*, when the fruits were harvested after 150 DAP. Germination percentages above 90% were recorded in fruits from the hand cross-pollination or natural pollination, harvested at 210 DAP and cultured for more than 30 days. The germination of *B. tuberculata* is more linked to the maturation of the fruit, since there was little influence of exogenous supply of cytokinin on seed germination *in vitro*. The number of protocorm of hand cross-pollination and natural pollination is higher in the fruits collected at 180 DAP. The percentage of protocorms in stage 1 (% P1) formed by hand cross-pollination and natural pollination is higher in fruit collected at 150 DAP. The percentage of protocorms in stage 4 (%P4) is higher in fruits collected at 150 DAP derived from natural pollination, and at 210 DAP, those derived from hand cross-pollination. The use of liquid and solid media favors the germination of *B. tuberculata*. Seeds of *B. tuberculata* stored for 90 days resulted in germination above 70%. The plants of *B. tuberculata*, have higher initial growth when cultured on MS medium with concentration between 70 and 75 %. Use of MS 50% medium is promising when the objective is the *in vitro* multiplications of *B. tuberculata*.

Keywords: Orchidaceae, growth regulators, *in vitro* cultivation, seed storage, culture medium, gelling agent, native orchid, propagation.

INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de grande valor comercial, devido a capacidade de combinação genética, beleza, diversidade de cor, forma e durabilidade de suas flores (PASQUAL et al., 2011), sendo cultivadas comercialmente em todo o mundo como flor de corte e plantas de vasos (ASGHAR et al., 2011).

O Brasil é um centro de origem de muitas espécies de orquídeas, e a valorização de espécies nativas elevou sua participação no comércio exterior de mudas (MATTIUZ et al., 2006). As exportações de mudas de orquídeas brasileiras, embora ainda pequena, continuam se destacando no mercado internacional, apresentando no primeiro semestre de 2010 vendas no valor de US\$ 87,8 mil. As mudas de orquídeas exportadas são espécies nativas e seus híbridos naturais, destinadas especialmente ao mercado de colecionadores (JUNQUEIRA e PEETZ, 2010).

Devido à elevada importância ornamental de suas flores, as orquídeas vêm sendo coletadas indiscriminadamente da natureza (ABBAS et al., 2011; ABRAHAM et al., 2012). Associado a isso, a destruição de grandes áreas de seu habitat, limitam e reduzem sua distribuição e abundância, levando muitas espécies a serem catalogadas como ameaçadas de extinção (SWARTS e DIXON, 2009).

As plantas da família Orchidaceae, apresentam desenvolvimento muito lento, desde a germinação das sementes até a fase adulta, requerendo maior período de cultivo antes de serem comercializadas, o que contribui para o elevado valor unitário de suas plantas no mercado. Assim, existe grande interesse na diminuição do tempo de formação da muda dessa orquídea, com consequente redução dos custos de produção (VICHATO et al., 2007).

Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias dentro das angiospermas, contendo cerca de 800 gêneros, 35.000 espécies e mais de 120.000 híbridos naturais e artificiais (FARIA et al., 2010). No Brasil já foram descritos 240 gêneros e 2.449 espécies (BARROS et al., 2013).

O gênero *Brassavola* é encontrado desde o México até a Argentina (BELLONE, 2006), este gênero é um dos mais conhecidos no Brasil (PAULA e SILVA, 2006), constituído por oito espécies, dentre elas *Brassavola tuberculata* Hook, de ocorrência nos estados da região norte (Tocantins), nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Sergipe), sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), sul

(Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (BARROS et al., 2013) e centro oeste (Mato Grosso do Sul) (RECH et al., 2011).

A espécie *B. tuberculata* é uma planta epífita, com hastes finas de no máximo 15 cm, cada uma com uma folha coriácea, de menos de 50 cm de comprimento, mais ou menos curvada, semicilíndrica e com uma nervura longitudinal (BELLONE, 2006). Apresenta florada abundante e duradoura com inflorescências contendo cinco a sete flores de coloração branca levemente amarelada, labelo largo e extremidade pontiaguda, exalando odor levemente adocicado, no crepúsculo (BELLONE, 2006; RECH et al., 2010).

Para a conservação destas espécies, a proteção *in situ* deve ser integrada a métodos de conservação *ex situ*, como a propagação de plantas e bancos de sementes (DOWLING e JUSAITIS, 2012). Desta forma, os bancos de sementes de orquídeas possibilitam o armazenamento de um grande número de sementes, a curto ou longo prazo (MACHADO NETO e CUSTÓDIO, 2005). Tanto o armazenamento de sementes como a manutenção a longo prazo de coleções ativas para conservação dos recursos genéticos (BERJAK e PANMENTER, 2008), são imprescindíveis para a produção de mudas *in vitro*, escalonadas em diferentes épocas do ano.

As sementes de orquídeas mesmo produzidas aos milhares, não possuem reservas nutritivas (LUAN et al., 2006), necessárias à germinação (FERREIRA et al., 2010), e não apresentam endosperma funcional (SANTOS et al., 2007). Portanto, essas sementes na natureza necessitam de associações com fungos simbióticos para germinar, onde apenas 0,2% a 0,3% germinam (KERBAUY e CHAER, 2010).

A formação das sementes inicia-se com polinização natural ou manual, que ocorre pela transferência do pólen de uma flor para o estigma da mesma flor (autopolinização), ou para flores de plantas diferentes (polinização cruzada) (ARAÚJO, 2012). Porém, em Orchidaceae a existência de mecanismos florais ou barreiras genéticas, dificultam a autopolinização natural em algumas espécies, sendo a polinização cruzada essencial para conservação da diversidade genética (BHOYROO et al., 2011).

A germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, ou propagação de orquídeas sem o auxílio do fungo micorriza presente na natureza, tem se mostrado uma ferramenta eficiente para produção de plantas comercialmente importantes (KAUTH et al., 2006; ZENG et al., 2012), pois resulta em maiores porcentagens de germinação, em relação às condições naturais, viabilizando sua utilização em projetos de reintrodução na

natureza (MARTINI et al., 2001; SUZUKI et al., 2010) e para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (DUTRA et al., 2009).

A germinação de sementes de orquídeas inicia-se pelo intumescimento da semente, seguido pelo rompimento do tegumento seminal e liberação do embrião. O embrião se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, chamada protocormo (ARDITTI, 1992; PASQUAL, 2001; KRAUS et al., 2006; ROY et al., 2011). A formação de protocormos é considerada uma peculiaridade do desenvolvimento pós-seminal em orquídeas e sua forma é táxon específica (BATIGYNA et al., 2003; HOSSAIN et al., 2010).

No cultivo *in vitro* os meios nutritivos fornecem os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo estabelecidos a partir das exigências das plantas, podendo ser modificados para atender os requerimentos de cada espécie (CALDAS et al., 1998; VENTURA et al., 2007). Um dos meios de cultura mais utilizados para propagação *in vitro* de Orchidaceae é o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (GEORGE e KLERK, 2008; SUZUKI et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; COLOMBO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012). No entanto, como este meio possui elevada concentração de nutrientes, para algumas espécies pode não ser o mais adequado, necessitando a redução de sua concentração ou outras modificações (REGO-OLIVEIRA, 2005; STANCATO et al., 2008; LI e XU et al., 2009).

Segundo Hoffmann et al. (1997), a redução das concentrações de sais nos meios de cultura, promove o melhor crescimento de tecidos em orquídeas. Assim a determinação da concentração ideal do meio MS, para cada espécie, potencializa o seu crescimento (PASQUAL et al., 1997).

Dependendo da espécie, o meio nutritivo para germinação assimbiótica de orquídeas pode ter consistência sólida ou líquida. Nos meios sólidos, o ágar tem sido utilizado pela sua grande eficiência como agente geleificante e dando suporte ao desenvolvimento de plantas no meio de cultura (FARIA et al., 2006). No entanto, os meios mais consistentes, que apresentam maior quantidade de ágar, poderão interferir na absorção de água e nutrientes pelos tecidos (KUSUMOTO et al., 1998). Nos meios líquidos, além da vantagem de redução de custos, maior facilidade no preparo e maior homogeneidade, requerem menor concentração de sais em comparação ao meio sólido (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Além da concentração e consistência do meio, o sucesso da cultura assimbiótica depende do período ideal para colheita de frutos (MWEETWA et al., 2008)

já que a semeadura *in vitro* pode ser realizada com as sementes oriundas de cápsulas fisiologicamente maduras ou não, sendo as últimas colhidas ainda verdes, antes de sua deiscência natural (STANCATO et al., 2001). O uso de cápsulas imaturas, técnica conhecida como “green pod culture”, vem sendo muito utilizada e baseia-se no fato de que as sementes nesse estágio de desenvolvimento germinam e produzem mudas, desde que a cápsula tenha ultrapassado dois terços do tempo entre a polinização e a deiscência natural (DE et al., 2006), reduzindo o tempo para a coleta dos frutos e evitando contaminações (KALIMUTHU et al., 2007).

Vários hormônios atuam na formação dos frutos bem como na germinação das sementes entre eles as citocininas (TAIZ e ZEIGER, 2009). As sementes de orquídeas geralmente não apresentam endosperma e cotilédones, sendo gotículas de lipídios as únicas substâncias de reserva contidas no embrião utilizadas durante a germinação (SUZUKI et al., 2009), estas citocininas são responsáveis pela mobilização desses lipídios viabilizando o processo de germinação (MANNING E VAN STADEN, 1987).

As citocininas são uma das classes de reguladores de crescimento mais utilizadas no cultivo *in vitro* (CALDAS et al., 1998), sendo necessárias para a divisão e diferenciação das células vegetais *in vitro* (TAIZ E ZEIGER, 2009), induzindo a morfogênese de orquídeas (PANT e SWAR, 2011). Portanto, o uso de reguladores de crescimento estimulam o processo de germinação e a formação de protocormos que antecedem o desenvolvimento das plantas (SANTOS et al., 2007; PRADHAN e PANT, 2009; PANT e SWAR, 2011).

O meio de cultura deve fornecer os nutrientes necessários para germinação, desenvolvimento e crescimento inicial *in vitro* de orquídeas, sendo específicos para cada espécie estudada (PASQUAL, 2001; CALDAS et al., 1998). Além da propagação *in vitro* dessas espécies de plantas e o armazenamento de suas sementes contribui para a preservação de sua variabilidade genética (MACHADO NETO e CUSTÓDIO, 2005).

Diante do exposto, buscou-se com este trabalho verificar se o efeito de citocininas, o período de maturação de frutos e o tempo de cultivo interferem na germinação de sementes de orquídeas oriundas de diferentes tipos de polinização; verificar se o uso de citocininas e o período de maturação de frutos interferem na formação de protocormos de orquídeas oriundas de diferentes tipos de polinização; verificar se a concentração do meio MS interfere no crescimento inicial de orquídeas e

verificar se o tempo de armazenamento de sementes e a concentração de ágar dos meios de cultivo interferem na germinação de sementes de orquídeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, B.; LISTYORINI, F. H.; AMRIATI, B. *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). **International Research Journal of Plant Science**, New Jersey, v. 2, n. 5, p. 154-159, 2011.

ABRAHAM, S.; AUGUSTINE, J.; THOMAS, T. D. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 18, n. 3, p. 245–251, 2012.

ARAÚJO, A. G. de. Aplicação da cultura de tecidos para a multiplicação de espécies em extinção: o caso das orquídeas. In: Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, 3., 2012. Aracaju. **Anais...** Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2012. p. 17-22.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley, 1992. 691 p.

ASGHAR, S.; AHMAD, T.; HAFIZ, I. A.; YASEEN, M. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 16, p. 3097-3103, 2011.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 21 out. 2013.

BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A.; VASILYEVA, V. E. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracov, v. 45, n. 2, p. 21–34, 2003.

BELLONE, R. **Orquídeas: Guía del aficionado**. Ediciones Omega. Barcelona. 2006. 544 p.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, p. 213-228, 2008.

BHOYROO, V.; PUCHOOA, D.; SANMUKHIYA, V. M. An assessment of plant growth regulators on asymbiotic development and germination of immature embryos of *Beclardia macrostachya* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 2, p. 30-33, 2011.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de**

plantas. Brasília: EMBRAPA-Serviço de Produção de Informação/EMBRAPA-CNPB, 1998. v. 1, p.87-132.

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T. de. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.6, p. 873-876, 2012.

DE, K. K.; MAJUMDAR, S.; SHARMA, R.; SHARMA, B. Green pod culture and rapid micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. – A horticultural and medicinal orchid. **Folia Horticulturae**, Krakow, v.18, n.1, p.81-90, 2006.

DOWLING, N.; JUSAITIS, M. Asymbiotic *in vitro* germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 60, p. 592-601, 2012.

DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 235-243, 2009.

FARIA, R. T. de, ASSIS, A. M. de; CARVALHO, J. F. R. P. de. **Cultivo de Orquídeas**. Londrina: Mecenaz, 2010. 208 p.

FARIA, R. T. de; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. da. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T. de; RIBEIRO, J. P. N.; CASALI, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

GEORGE, E. F.; KLERK, G. J. D. The components of plant tissue culture media I: macro and micro nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. Dordrecht: Springer. 2008. p. 65-113

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 385p. 1998. p. 183-260.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos - Tecnologia e aplicações: aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 130 p.

HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; SILVA, J. A. T. da; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 479-487, 2010.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira. 1º semestre de 2010. **Hórtica**. São Paulo. Disponível em:

<http://www.hortica.com.br/artigos/2010_1_Sem_Com_Exterior_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 28 out. 2013.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, S. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 10, p. 1171-1174, 2007.

KAUTH, P. J.; VENDRAME, W. A.; KANE, M. E. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 91-102, 2006.

KERBAUY, G. B.; CHAER, L. Micropropagação comercial de orquídeas: Conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1 ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 177-205.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e concentuais. *Hoehnea*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 177-184, 2006.

KUSUMOTO, M. Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Quioto, 48, n. 4, p. 503-509, 1980.

LI, Z. Y.; XU, L. *In vitro* propagation of white-flower mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Through immature seed-derived protocorm-like bodies. **Journal of Horticulture and Forestry**, Timișoara, v. 1, n. 6, p. 96-97, 2009.

LUAN, V. Q.; THIEN, N. Q.; KHIEM, D. V.; NHUT, D. T. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University Ho Chi Minh City**. Vietnam, p. 175-177, 2006.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, Sarasota, v. 25, n. 2, p. 229-235, 2005.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.35, n. 3, p.343-53, 1987.

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

MATTIUZ, C. F. M.; RODRIGUES, T. de J. D.; MATTIUZ, B. Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 21-30, 2006.

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

MWEETWA, A. M.; WELBAUM, G. E.; TAY, D. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 257-262, 2008.

PANT, B.; SWAR, S. Micropropagation of *Cymbidium iridioides*. **Nepal Journal of Science and Technology**, Kathmandu, v. 12, p. 91-96, 2011.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações** - introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

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

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 324-329, 2011.

PAULA, C. C. de; SILVA, H. M. P. da. **Orchids: Botany and Growing**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV. 2006. 106 p.

PRADHAN, S.; PANT, B. *In vitro* seed germination in *Cymbidium elegans* Lindl. and *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. (Orchidaceae). **Journal of Plant Science**, Kathmandu, v. 6, p. 100-102, 2009.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; MANENTE-BALESTIERI, F. C. de L. Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb.f. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 335-341, 2010.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

REGO-OLIVEIRA, L. do V.; FARIA, R. T. de. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional cultura media and comercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. de A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizantes mineral. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, 2012.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 325–331, 2011.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. de P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. da C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **Iniciação Científica Cesumar**, Maringá, v. 9, n. 1, p. 07-12, 2007.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C.; Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 51-57, 2008.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Choron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 04, p. 657-666, 2009.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

VENTURA, G. M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

VICHIATO, M. R. de M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M. de; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 16-20, 2007.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T. da; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 198-209, 2012.

CAPÍTULO I: ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS, BAP E TEMPO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

RESUMO

A germinação assimbiótica de sementes de orquídeas é mais eficaz que a germinação em condições naturais, sendo assim, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da concentração de 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,1; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹), da maturação dos frutos (60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização - DAP) e de três tempos de cultivo (15, 30 ou 45 dias) no processo de germinação assimbiótica de sementes de *Brassavola tuberculata*, oriundas de três tipos de polinização (autopolinização manual, polinização cruzada manual ou polinização natural). Foi utilizado o meio de cultura MS ½, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, enriquecido com as concentrações de BAP. Após a semeadura, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob 25±2°C e fotoperíodo de 12h. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela sub-subdivididas, sendo alocadas nas parcelas as concentrações de BAP, nas subparcelas a maturação dos frutos e, nas sub-subparcelas os tempos de cultivo, com três repetições. Aos 15, 30 e 45 dias após a semeadura, foram feitas avaliações de porcentagem de germinação, que foram submetidas à análise de variância e posteriormente à regressão. A autopolinização manual produziu sementes que não germinaram *in vitro*, enquanto que as sementes produzidas por polinização cruzada manual ou polinização natural produziram sementes que germinaram *in vitro* quando os frutos foram colhidos a partir dos 150 DAP. Porcentagem de germinação superior a 90% foi registrada em frutos oriundos dos dois tipos de polinização, colhidos aos 210 DAP e cultivados por período superior a 30 dias. A germinação de *B. tuberculata* está mais vinculada ao estágio de maturação dos frutos uma vez que houve pouca influência do fornecimento exógeno de citocinina sobre a sua germinação *in vitro*.

Palavras-chave: Orchidaceae, regulador de crescimento, cultivo *in vitro*.

MATURATION OF FRUITS, BAP AND CULTURE TIME ON *IN VITRO* GERMINATION OF *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae).

ABSTRACT

Asymbiotic germination of orchid seeds is more effective than germination in natural conditions, therefore, this study aimed to evaluate the effect of the concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.1, 1.0 or 2.0 mg L⁻¹), fruit maturation (60, 90, 120, 150, 180 or 210 days after pollination - DAP) and three culture time (15, 30 or 45 days) in the process of seed germination asymbiotic *Brassavola tuberculata*, from three types of pollination (hand self-pollination, hand cross-pollination or natural pollination). Was used MS ½ medium added 30 g L⁻¹ sucrose supplemented with different concentrations of BAP. After sowing, the flasks were kept in a growth chamber at 25±2°C and photoperiod of 12h. The experimental design was completely randomized, and treatments were arranged in split split-plot, being allocated in the plots the concentrations of BAP, in the slitplots fruit maturation and split split-plots the culture times, with three replications. At 15, 30 and 45 days after sowing were evaluated for germination, which were submitted to analysis of variance and regression later. A hand self-pollination produced seeds that did not germinate *in vitro*, whereas the seeds produced by hand crosspollination or natural pollination, produced seeds that germinated *in vitro*, when the fruits were harvested at 150 DAP. Germination percentages above 90% were recorded in fruits from the hand cross-pollination or natural pollination, harvested at 210 DAP and cultured for a period exceeding 30 days. The germination of *B. tuberculata* is more linked to the maturation of the fruit, since there was little influence of exogenous supply of cytokinin on seed germination *in vitro*.

Keywords: Orchidaceae, growth regulators, *in vitro* cultivation.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas pelo grande valor comercial decorrente da beleza e exotismo de suas flores (SCHNITZER et al., 2010). A família Orchidaceae encontra-se distribuída por todo o mundo, embora o maior número de espécies ocorra em regiões tropicais (SUTTLEWORTH et al., 1994). Essa família botânica compreende cerca de 800 gêneros e 35.000 espécies (FARIA et al., 2010) e, no Brasil, são descritos 240 gêneros e aproximadamente 2449 espécies (BARROS et al., 2013).

Brassavola é um dos gêneros mais conhecidos no Brasil (PAULA e SILVA, 2006), composto de oito espécies, dentre elas *Brassavola tuberculata* Hook (Figura 1) (BARROS et al., 2013), que ocorre em vários estados, incluindo o Mato Grosso do Sul (RECH et al., 2011). O gênero destaca-se por seu elevado valor florístico e rusticidade, sendo amplamente utilizado na produção de híbridos duplos e triplos com *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronitis* e *Epidendrum* (SOARES et al., 2012).



FIGURA 1. A) *Brassavola tuberculata* Hook em seu habitat; B) Planta de *Brassavola tuberculata* Hook.; C) detalhe da flor de *Brassavola tuberculata* Hook.; D) Frutos de *Brassavola tuberculata* Hook. (Barra = 1 cm). Dourados, UFGD, 2013.

As plantas da família Orchidaceae, apresentam desenvolvimento muito lento, requerendo maior período de cultivo antes de serem comercializadas, o que contribui para o seu elevado valor no mercado. Assim sendo, existe grande interesse na redução do tempo de formação de mudas dessas plantas, como forma de minimizar os custos de produção (VICHATO et al., 2007).

Neste sentido, a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas tem sido utilizada tanto para a produção comercial dessas plantas (KAUTH et al., 2006) quanto para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, pois resulta em maiores porcentagens de germinação, quando comparada com a germinação em condições naturais (MARTINI et al., 2001; MWEETWA et al., 2008; DUTRA et al., 2009).

Outra vantagem da cultura assimbiótica de Orchidaceae é que o processo muitas vezes não depende do estado de maturação fisiológica dos frutos já que a semeadura *in vitro* pode ser realizada com as sementes oriundas de frutos fisiologicamente maduros ou não, sendo os últimos colhidos ainda verdes, antes de sua deiscência natural (STANCATO et al., 2001). O uso de cápsulas imaturas, técnica conhecida como “green pod culture”, vem sendo amplamente utilizada e baseia-se no fato de que as sementes nesse estágio de desenvolvimento germinam e produzem mudas, desde que a cápsula tenha ultrapassado dois terços do tempo entre a polinização e a deiscência natural (DE et al., 2006), reduzindo o tempo para a coleta dos frutos e evitando contaminações (KALIMUTHU et al., 2007).

De et al. (2006), obtiveram porcentagem de germinação entre 80 a 90% ao utilizarem sementes oriundas de frutos imaturos de *Dendrobium chrysanthum* Wall. Também, Temjensangba e Deb (2006), obtiveram 90% de germinação de sementes de *Cleisostoma racemiferum* (Lindl.) Garay, obtidas de frutos colhidos 60 dias após a polinização. Para *Phalaenopsis amabilis* Blume, 96% das sementes colhidas 90 dias após a polinização produziram protocormos aos 50 dias da semeadura (MWEETWA et al., 2008). Entretanto, Bhoyroo et al. (2011), obtiveram porcentagem de 31,5% de germinação em *Beclardia macrostachya* (Thouars) A. Rich., com sementes imaturas provenientes de frutos colhidos aos 60 dias após a polinização, indicando que cada espécie responde diferentemente ao processo “green pod culture”.

Os tipos de polinização também influenciam a formação de frutos e de sementes em orquídeas. A reprodução de orquídeas é dependente dos mecanismos de polinização de cada espécie e da diversidade de agentes polinizadores, que contribuem para o sucesso da transferência de pólen entre os indivíduos. Em Orchidaceae a maioria

das espécies é autocompatível, no entanto, a maioria das espécies possui mecanismos florais, ou barreiras genéticas, que evitam a formação de frutos por autopolinização (PANSARIN, 2003; PANSARIN e AMARAL, 2006).

Além da polinização natural, em orquidáceas, é comum a utilização da polinização manual, realizada através da remoção de políneas de uma flor e sua deposição no estigma da mesma ou de outra flor (PANSARIN, 2003). “Polinizações manuais, realizadas em condições experimentais promovem aumento na produção de frutos de muitas espécies de Orchidaceae, quando comparado com as populações em ambiente natural” (MICKELIUNAS et al., 2006).

Polinização cruzada manual, realizada na espécie *Epidendrum paniculatum*, possibilitou que 95,6% das flores fecundadas formassem frutos, enquanto, na autopolinização manual apenas 1,28% das flores fecundadas, formaram frutos (PANSARIN, 2003). Na espécie *Cattleya eldorado*, flores polinizadas por autopolinização manual, geraram 41,5% de frutos, enquanto a polinização cruzada gerou 75,5% de frutos e a polinização natural, formou apenas 3,1% de frutos (STORTI et al., 2011).

Um dos meios de cultura mais utilizados para propagação *in vitro* de Orchidaceae é a formulação de Murashige e Skoog (1962), com variações na concentração de seus constituintes, assim como a adição ou não de ágar. No entanto, o meio líquido apresenta a vantagem de redução de custos, maior facilidade no preparo e maior homogeneidade, além disso, requer menor concentração de sais em comparação ao meio sólido (PASQUAL, 2001).

Segundo Taiz e Zeiger (2009), vários hormônios atuam na formação dos frutos bem como na germinação das sementes entre eles as citocininas. As sementes de orquídeas geralmente não apresentam endosperma e cotilédone, sendo gotículas de lipídios as únicas substâncias de reserva contidas no embrião (SUZUKI et al., 2009). Manning e Van Staden (1987) relatam que as citocininas são responsáveis pela mobilização desses lipídios viabilizando o processo germinativo.

O estudo da aplicação exógena de citocininas no processo de semeadura assimbiótica de orquídeas baseia-se no fato que em condições naturais, vários fungos micorrízicos, que auxiliam o processo de germinação, produzem citocininas, levando-se à suposição de que a germinação dessas sementes e seu desenvolvimento na natureza podem estar relacionados à presença dessas citocininas fungicas (STEWART e KANE, 2006).

A adição de BAP (6-benzilaminopurina) no meio de cultura para a germinação de sementes de orquídeas tem apresentado respostas divergentes. Efeitos positivos foram relatados por De Pauw et al. (1995), em razão da adição de BAP (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg L⁻¹) ao meio MS, reduzindo o tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*. Efeitos negativos foram observados com a adição de BAP (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) ao meio MS ½, reduzindo a porcentagem de germinação de *Beclardia macrostachya* (BHOYROO et al., 2011). Em *Habenaria macroceratitis* a adição de 1 µM de BAP promoveu um efeito positivo na germinação, enquanto as concentrações de 3 e 10 µM a reduziram (STEWART e KANE, 2006).

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar os tipos de polinizações, o estágio de maturação de frutos, as concentrações de citocinina e o tempo de cultivo *in vitro* na germinação de *Brassavola tuberculata* Hook.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2011.

Foram utilizados frutos de *Brassavola tuberculata* Hook, (Figura 2) oriundos de três tipos de polinização: 1- polinização natural, 2- autopolinização manual e 3-polinização cruzada manual (para as duas últimas foram utilizadas oito políneas), produzidos por cinco plantas matrizes, com 12 anos de idade integrantes do acervo do orquidário da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD e colhidos aos 60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização (DAP). Em cada época de colheita foram utilizados três frutos de cada tipo de polinização.

Em cada período de colheita, os frutos oriundos de cada tipo de polinização, foram lavados com água e detergente neutro e desinfestados com álcool (70%). A seguir foram abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas das cápsulas e homogeneizadas respeitando-se cada tipo de polinização.

Para cada polinização, 0,005 g de sementes foram transferidas para tubos de ensaio e cada um deles recebeu 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio 0,5%. As suspensões de sementes foram acondicionadas em ambiente desprovido de luz e 25±2°C. Após 24 horas as suspensões foram acrescidas de 7 mL de água destilada e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação de sementes viáveis, em câmara de

Peters com o auxílio de um microscópio estereoscópico (SOARES et al., 2012). Foram consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente coradas ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis.

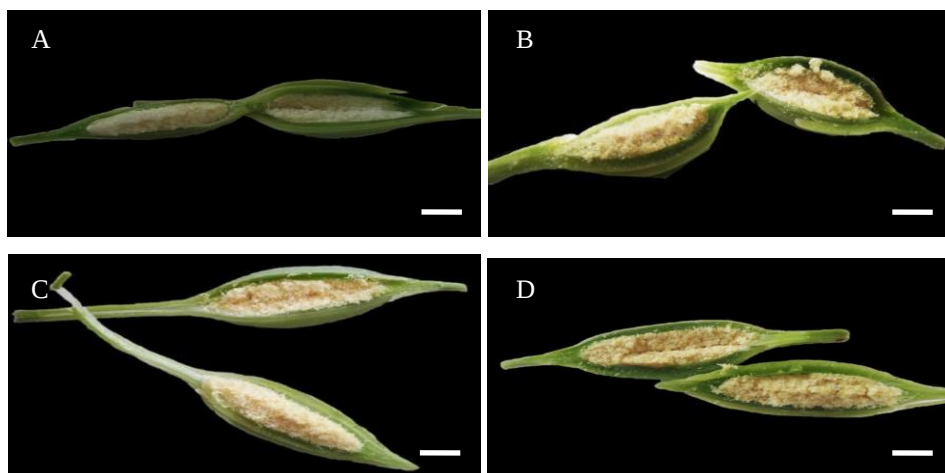


FIGURA 2. Frutos de *Brassavola tuberculata* Hook.colhidos aos 120 (A), 150 (B), 180 (C) e 210 (D) dias após a polinização (DAP). Barras = 1 cm. Dourados, UFGD, 2013.

Uma vez identificada a viabilidade, em ambiente asséptico, 0,05 g de sementes de cada polinização foram embebidas em água destilada estéril por 15 minutos. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfestadas por 15 minutos com uma solução composta por 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem as sementes receberam 120 mL de água destilada estéril.

O meio de cultura utilizado foi Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de seus componentes ($MS \frac{1}{2}$), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e das concentrações de BAP (0,0; 0,1; 1,0 ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) com o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com KOH (1M) e desprovido de agente geleificante. Foram utilizados como frascos de cultivo recipientes de polipropileno transparente, providos de tampa, com capacidade para 50 mL, e que após receberem 10 mL de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de $1,05 \text{ kg.cm}^{-2}$ por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu 200 μL de uma das suspensões de sementes oriunda de cada tipo de polinização. Após a semeadura os frascos foram

tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Aos 15, 30 e 45 dias de cultivo, três frascos de cada tratamento foram abertos, e o seu conteúdo foi vertido em placa de Petri e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, contou-se o número total de sementes ($N^{\circ}\text{TS}$) e o número de sementes com embriões clorofilados ($N^{\circ}\text{SEC}$). A porcentagem de germinação (%G) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: $\% G = [(N^{\circ}\text{SEC} \times 100) / N^{\circ}\text{TS}]$ (ROY et al., 2011)..

Os resultados decorrentes de cada tipo de polinização foram analisados separadamente utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos foram arranjos em esquema de parcelas sub-subdivididas. Foram alocadas na parcela, as concentrações de BAP, nas subparcelas o estágio de maturação dos frutos e nas sub-subparcelas os tempos de cultivo, com três repetições de um frasco de cultivo.

A variável, porcentagem de germinação foi transformada por meio da função $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetida à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). Havendo significância, os fatores qualitativos foram comparados por teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade) e os quantitativos por regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância com a significância ou não dos fatores analisados bem como a média geral das variáveis analisadas são apresentados no Quadro 1. A porcentagem de germinação (%G) dos frutos oriundos de autopolinização manual não consta do Quadro 1, pois as sementes não germinaram.

Houve efeito do estágio de maturação dos frutos (DAP) e do tempo de cultivo (TC) ($p<0,01$) sobre %G de *B. tuberculata*, de frutos oriundos de polinização cruzada manual (%GC) e de polinização natural (%GN), entretanto a adição de BAP no meio de cultivo não alterou significativamente ($p>0,05$) esses valores (Quadro 1).

Efeitos conjuntos ($p<0,01$) sobre as variáveis foram observados apenas com a combinação de DAP e TC e, interação tripla entre os fatores estudados ($p<0,01$), foi registrada apenas sobre a %GN.

Para todos os tipos de polinização estudados, frutos de *B. tuberculata* colhidos até 120 dias após a polinização (DAP) apresentaram sementes, que ao serem transferidas para os meios de cultivo, não germinaram. O que permite inferir que embora ocorra a fertilização, os embriões ainda não estão fisiologicamente aptos à germinação.

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundas de polinização cruzada manual (GC) e polinização natural (GN), em função das concentrações de BAP, dos dias após a polinização (DAP) e do tempo de cultivo (TC)

F.V.	Quadrados médios		
	G.L.	%GC	%GN
BAP	3	0,18 ^{ns}	1,48 ^{ns}
Erro 1	12	1,39	0,48
DAP	3	623,94**	398,19**
BAP x DAP	9	0,26 ^{ns}	0,82 ^{ns}
Erro 2	48	0,90	0,41
TC	2	34,97**	48,66**
BAP x TC	6	1,27 ^{ns}	0,58 ^{ns}
DAP x TC	6	38,51**	47,31**
BAP x DAP x TC	18	0,63 ^{ns}	0,99**
Erro 3	84	0,62	0,28
CV (%)		13,65	15,34
Média geral		44,4%	19,6%
Nº de sementes por frasco		70,0	71,5

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

Aos 150 DAP as sementes dos frutos oriundos de polinização natural (PN) ou de cruzada manual (PC) germinaram, entretanto com porcentagem de germinação inferior a 5% para tempo de cultivo de 15 dias (Figura 3A, 3B). Em tempos de cultivo de 30 e 45 dias, as sementes oriundas de PC apresentaram %G em torno de 40% enquanto que aquelas oriundas de PN em torno de 9% (Figura 3C, 3D, 3E, 3F).

Sementes de frutos colhidos aos 180 DAP e oriundos de PN apresentaram %G inferior a 20%, independentemente dos tempos de cultivo (Figura 3B, 3D, 3F), enquanto que aquelas oriundas de PC apresentaram %G igual a 33% quando cultivadas por 15 dias (Figura 3A) e em torno de 70% quando cultivadas por 30 ou 45 dias (Figura 3C, 3E).

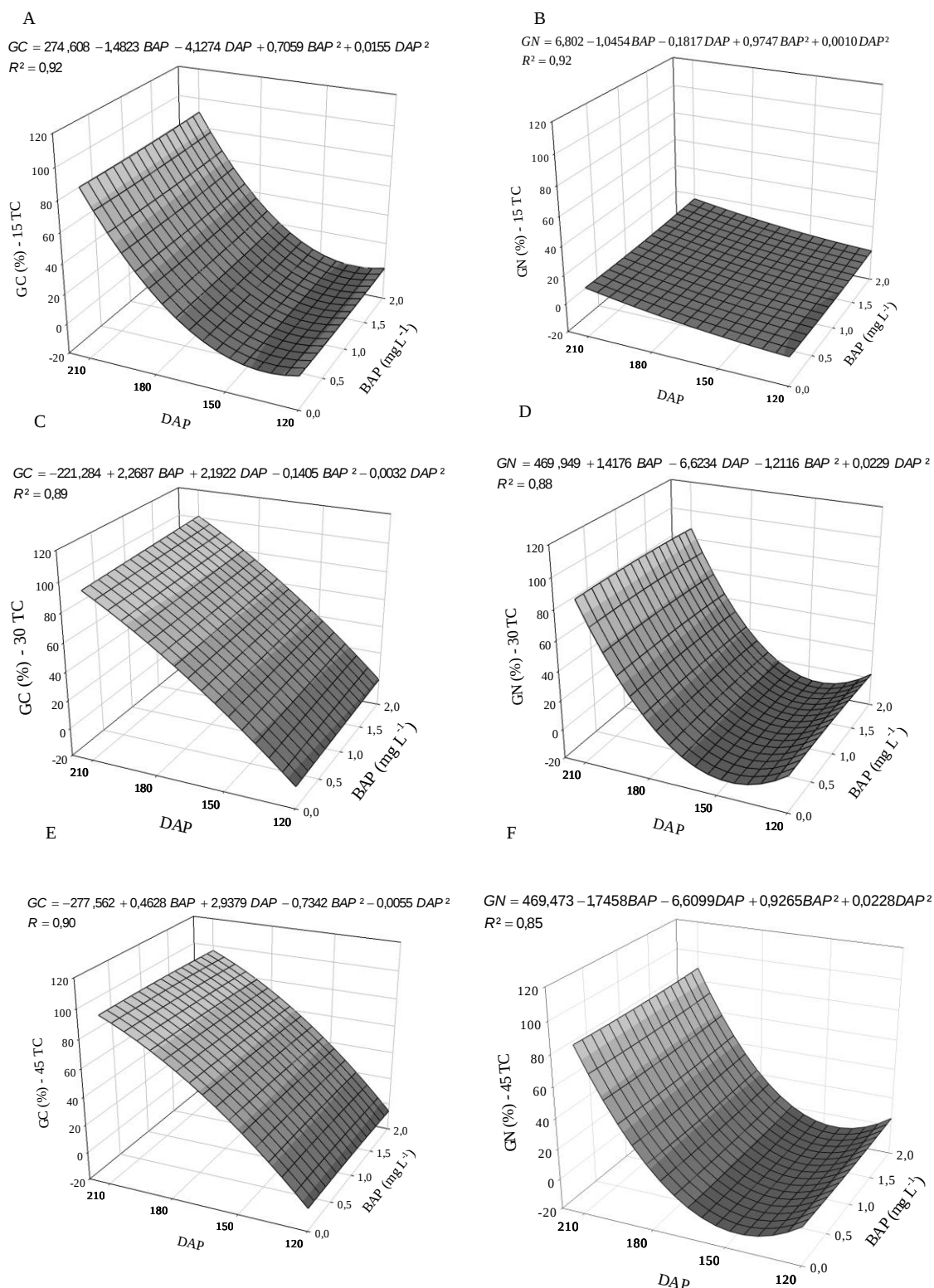


FIGURA 3. Porcentagem de germinação de sementes de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundas de polinização cruzada manual (GC) e polinização natural (GN), em função do tempo de cultivo 15TC(A,B), 30 TC (C,D) e 45 TC (E,F), época de maturação dos frutos (DAP) e concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013.

Sementes oriundas de frutos colhidos aos 210 DAP apresentaram %G superior a 90% quando cultivados por 30 ou 45 dias, independentemente do tipo de polinização e das concentrações de BAP. Quando cultivadas por 15 dias houve variação na %G em função do tipo de polinização. Enquanto sementes oriundas de PC apresentaram %G em torno de 90%, aquelas oriundas de PN apresentaram %G em torno de 12,5% (Figura 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F).

A porcentagem de germinação de *B. tuberculata* foi mais influenciada pelo estágio de maturação dos frutos e pelo tipo de polinização do que pela adição de BAP no meio de cultivo. Independentemente das concentrações de BAP, em frutos oriundos de PC, porcentagem de germinação de sementes superior a 50% foram calculadas para frutos com estágio de maturação estimado de 200 DAP quando cultivadas por 15 dias e de 160 DAP quando cultivadas por 30 ou 45 dias. Para frutos oriundos de PN, porcentagem de germinação de sementes superior a 50% só pode ser observada em frutos com estágio de maturação estimado de 195 DAP quando cultivadas por 30 ou 45 dias (Figura 3D, 3F).

Em decorrência destes resultados, a utilização de frutos imaturos de *B. tuberculata* pode ser recomendada quando o estágio de maturação dos frutos for em torno de 75% (160 DAP) para frutos oriundos de PC e de 90% (190 DAP) para aqueles oriundos de PN, uma vez que a deiscência natural (100 % do estágio de maturação fisiológica) ocorre em torno dos 210 DAP.

As variações entre a %G de frutos oriundos de PC e PN podem ser decorrentes do fato de que em polinizações naturais, pode ocorrer de algumas políneas não serem depositadas, diminuindo a quantidade de pólen, ou o pólen ser inapropriado, inviabilizando a fecundação dos óvulos (NADEAU et al., 1996; TREMBLAY et al., 2005; FREITAS et al., 2010).

Independentemente do tipo de polinização utilizada, das concentrações de BAP e dos tempos de cultivos avaliados, as sementes de *B. tuberculata* apresentaram maiores porcentagens de germinação quando os frutos foram colhidos aos 210 DAP. Segundo Munoz e Jiménez (2008), frutos maduros apresentam maior porcentagem de germinação em decorrência da maior quantidade de sementes viáveis em comparação a frutos imaturos.

Os valores percentuais em torno de 100% observados em sementes oriundas de PC para esta espécie fornecem valiosa informação para futuros trabalhos relacionados à sua multiplicação, uma vez que permite o controle do material genético a

ser multiplicado e possibilita elevada diversidade genética. Além disso, o sucesso da germinação dessas sementes é fato importante para manutenção de populações estáveis na natureza (BHOYROO et al, 2011).

O uso de citocinina no meio de cultura teve pouca influência sobre porcentagem de germinação de *B. tuberculata* em todas as situações estudadas. Respostas semelhantes foram relatadas por Hossain et al. (2010), em relação à germinação de *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. Os autores obtiveram 75 e 76% de germinação em meio MS, com a utilização de 0,0 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente, resultados estes estatisticamente iguais.

Bhoyroo et al. (2011), estudando o efeito dos reguladores de crescimento BAP (0,0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) ou TDZ (0,0, 0,1 e 0,3 mg L⁻¹) acrescidos ao meio MS ½ modificado, verificaram que a máxima germinação (31,5%) de sementes *Beclardia macrostachya*, oriundas de cápsulas imaturas coletadas com dois meses de idade, provenientes de plantas polinizadas manualmente, foi obtida aos três meses de cultivo na ausência dos fitorreguladores.

Os resultados observados nos diferentes estudos indicam que as respostas germinativas podem variar consideravelmente entre diferentes gêneros e até mesmo entre espécies de um mesmo gênero (SUZUKI et al., 2010; SCHNEIDERS et al., 2012). Estes resultados podem estar associados à interação genótipo e citocinina, havendo, portanto, a necessidade de se otimizar, a cada genótipo, o nível exógeno ou mesmo o tipo de fitorregulador a ser adicionado ao meio (SUZUKI et al., 2004), bem como na forma em que as sementes são expostas aos reguladores de crescimento.

4. CONCLUSÕES

A polinização natural, polinização cruzada manual e a autopolinização manual de *B. tuberculata*, produzem sementes, entretanto apenas aquelas oriundas dos dois primeiros tipos de polinização germinam *in vitro*.

Houve pouca influência do fornecimento exógeno de citocinina sobre a germinação *in vitro* de *B. tuberculata*. As melhores porcentagens de germinação ocorrem quando os frutos são colhidos 210 dias após a polinização e cultivados por período igual ou superior a 30 dias.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 21 out. 2013.
- BHOYROO, V.; PUCHOOA, D.; SANMUKHIYA, V. M. An assessment of plant growth regulators on asymbiotic development and germination of immature embryos of *Beclardia macrostachya* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 2, n. 1, p. 30-33, 2011.
- DE, K. K.; MAJUMDAR, S.; SHARMA, R.; SHARMA, B. Green pod culture and rapid micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. – A horticultural and medicinal orchid. **Folia Horticulturae**, Krakow, v.18, n.1, p.81-90, 2006.
- DE PAUW, M. A.; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London v. 75, p. 267-275, 1995.
- DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 235-243, 2009.
- FARIA, R. T. de; ASSIS, A. M. de; CARVALHO, J. F. R. P. de. **Cultivo de Orquídeas**. Londrina: Mecenias, 2010. 208 p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – a computer statistical analysis system**. Versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA. 2011.
- FREITAS, L.; WOLOWSKI, M.; SIGILIANO, M. I. Ocorrência de limitação polínica em plantas de mata atlântica. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 251-265, 2010.
- HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; SILVA, J. A. T. da; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 479-487, 2010.
- KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R.; VIJAYAKUMAR, S. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 10, p. 1171-1174, 2007.
- KAUTH, P. J.; VENDRAME, W. A.; KANE, M. E. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 91–102, 2006.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.35, n. 3, p.343-353, 1987.

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

MICKELIUNAS, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 251-258, 2006.

MUNOZ, M.; JIMÉNEZ, V. M. Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana*, Cartago, v. 8, n. 2, p. 23-31, 2008.

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

MWEETWA, A. M.; WELBAUM, G. E.; TAY, D. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 257-262, 2008.

NADEAU, J. A.; ZHANG, X. S.; LI, J.; O'NEILL, S. D. Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 213-239, 1996.

PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. do C. E. Biologia reprodutiva e polinização de duas espécies de *Polystachya* Hook. no sudeste do Brasil: evidência de pseudocleistogamia em *Polystachyeae* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 423-432, 2006.

PANSARIN, E. R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 203-211, 2003.

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

PAULA, C. C. de; SILVA, H. M. P. da. **Orchids: Botany and Growing**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV. 2006. 106 p.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do rio dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff

ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 325–331, 2011.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. de; VENTURA, M. U.; SORACE, M. Substratos e extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas brasileiras *Cattleya intermedia* (John Lindley) e *Miltonia clowesii* (John Lindley) (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 139-143, 2010.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

STORTI, E. F.; BRAGA, P. I. S.; SORTI FILHO, A. Biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado*, uma espécie de Orchidaceae das campinas amazônicas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 361-368, 2011.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling developmente of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 2, p. 147-158, 2006.

SUTTLEWORTH, F. S., ZIM, H. S.; DILON, G. W. **Orquídeas: Guia dos orquidófilos**. Tradução: LEMA FILHO, J. G., 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Expressão e Cultura. 1994. 158 p.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

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

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Choron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 04, p. 657-666, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TEMJENSANGBA; DEB, C. R. Effect of diferente factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of

Cleisostoma racemiferum (Lindl.) Garay. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 5, n. 2, p. 223-228, 2006.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D.; ZIMMERMAN, J. K.; CALVO, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, n. 1, p. 1-54, 2005.

VICHIATO, M. R. de M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M. de; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 16-20, 2007.

CAPÍTULO II: TIPOS DE POLINIZAÇÃO, ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE FRUTOS E BAP NO DESENVOLVIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE).

RESUMO

O desenvolvimento de protocormos a partir de sementes germinadas de orquídeas é um método eficaz de formação de novas plantas, devido a isso, objetivou-se neste trabalho avaliar os estádios de desenvolvimento inicial *in vitro* de *Brassavola tuberculata*, em resposta à utilização de 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,1; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹), da maturação dos frutos (60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização - DAP) e de três tipos de polinização (autopolinização manual, polinização cruzada manual ou polinização natural). Foi utilizado o meio de cultura MS ½, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, enriquecido com as concentrações de BAP. Após a semeadura, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob 25±2°C e fotoperíodo de 12h. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela sub-subdivididas, sendo alocados nas parcelas os tipos de polinização, nas subparcelas as concentrações de BAP e, nas sub-subparcelas o período de maturação dos frutos, com três repetições. Aos 150 dias após a semeadura, foram feitas avaliações do número de protocormos, da porcentagem de protocormos em diferentes estádios de desenvolvimento e do número de protocormos mortos, sendo submetidos a análise de variância e posteriormente à regressão. O número de protocormos da polinização cruzada manual e da polinização natural é maior em frutos coletados aos 180 DAP. A porcentagem de protocormos em estágio 1(%P1) formada pela polinização cruzada manual e polinização natural é maior em frutos coletados aos 150 DAP. A porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) é maior em frutos coletados aos 150 DAP oriundos de polinização natural e, aos 210 DAP, naqueles oriundos de polinização cruzada manual.

Palavras-chave: Orchidaceae, regulador de crescimento, cultivo *in vitro*.

POLLINATION TYPES, MATURATION OF FRUITS AND BAP ON *IN VITRO* INITIAL DEVELOPMENT OF *Brassavola tuberculata* Hook. (ORCHIDACEAE)

ABSTRACT

The development of protocorms obtained from orchid germinated seeds is a quick method of forming new plants, on account of it, the aim of this work was to evaluate the initial stages of *in vitro* development of *Brassavola tuberculata*, in response to the use of 6- benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.1, 1.0 or 2.0 mg L⁻¹), fruit maturation (60, 90, 120, 150, 180 or 210 days after pollination - DAP) and three types of pollination (hand self-pollination, hand cross-pollination or natural pollination). It was used ½ MS medium, added 30 g L⁻¹ sucrose, supplemented with different concentrations of BAP. After sowing, the flasks were kept in a growth room at 25±2°C and photoperiod of 12h. The experimental design was completely randomized, and the treatments were arranged in split split plot, in which the types of pollination were allocated in the plots, the concentrations of BAP were in the sliptplots and the period of maturation were in the split split-plots, with three replicates. At 150 days after sowing, we evaluated the number of protocorms, the percentage of protocorms in different stages of development and the number of dead protocorms, and the data were submitted to analysis of variance and then to the regression. The number of protocorm of hand cross-pollination and natural pollination is higher in the fruits collected at 180 DAP. The percentage of protocorms in stage 1 (% P1) formed by hand cross-pollination and natural pollination is higher in fruit collected at 150 DAP. The percentage of protocorms in stage 4 (%P4) is higher in fruits collected at 150 DAP derived from natural pollination, and at 210 DAP, those derived from hand cross-pollination.

Keywords: Orchidaceae, growth regulators, *in vitro* cultivation.

1. INTRODUÇÃO

Com cerca de 25.000 espécies, Orchidaceae é uma das maiores famílias botânicas de angiospermas. Suas plantas podem ser epífitas, terrícolas ou rupícolas e colonizam com sucesso quase todos os habitats. Devido a sua extraordinária diversidade floral e a especificidade de seus polinizadores representam uma linha avançada da evolução floral em monocotiledôneas (FU et al., 2011).

O gênero *Brassavola* é encontrado desde o México até a Argentina (BELLONE, 2006) e *Brassavola tuberculata* Hook é uma espécie nativa nos Estados da região norte (Tocantins), nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Sergipe), sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (BARROS et al., 2013), sendo também reportada no Estado de Mato Grosso do Sul (RECH et al., 2011).

Brassavola tuberculata, é uma planta epífita, com hastes finas de no máximo 15 cm, cada uma com uma folha coriácea, mais ou menos cilíndrica, de menos de 50 cm de comprimento, com uma nervura longitudinal (BELLONE, 2006). Apresenta florada abundante e duradoura com inflorescências contendo cinco a sete flores de coloração branca levemente amarelada, com odor levemente adocicado, exalado no crepúsculo (RECH et al., 2010).

As orquídeas produzem frutos que contêm até 4 milhões de sementes não endospermicas e desprovidas dos nutrientes (LUAN et al., 2006), necessários à germinação do embrião (FERREIRA et al., 2010). Para germinarem naturalmente essas sementes necessitam de associações com fungos simbióticos e apenas de 0,2% a 0,3% conseguem germinar (KERBAUY e CHAER, 2011).

A formação de sementes de orquídeas tem início com a polinização natural ou manual, através da transferência do pólen de uma flor para o estigma da mesma flor (autopolinização), ou para flores de plantas diferentes (polinização cruzada) (ARAÚJO, 2012). Em Orchidaceae, a autopolinização natural é dificultada em algumas espécies, devido à existência de mecanismos florais ou barreiras genéticas, sendo a polinização cruzada essencial para manter elevada a diversidade genética (BHOYROO et al., 2011).

Segundo George (2008), o cultivo de sementes imaturas pode resultar em maior produção de plantas *in vitro* do que as provenientes de sementes maduras. Isso ocorre devido ao fato dos mecanismos de incompatibilidade pós-zigóticos ainda não terem sido acionados.

As sementes de orquídeas apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento. Inicia-se pelo intumescimento, que acarreta o rompimento do tegumento seminal com a liberação do embrião, que se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, chamado protocormo (ARDITTI, 1992). A formação do protocormos é considerada uma peculiaridade do desenvolvimento pós-seminal em orquídeas (BATIGYNA et al., 2003).

O desenvolvimento de protocormos a partir de sementes germinadas é um método rápido de formação de novas plantas (MOHANTY et al., 2012), tornando-se uma alternativa para a produção de um grande número de plantas (ARAÚJO et al., 2009), que podem ser utilizadas comercialmente ou para programas de reintrodução de espécies, em áreas de preservação ambiental (SCHNEIDERS et al., 2012).

Os meios nutritivos empregados no cultivo *in vitro* foram estabelecidos a partir das exigências das plantas, com modificações para atender necessidades específicas, fornecendo as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento de determinada espécie (VENTURA et al., 2007). O meio líquido tem sido bastante empregado para formação de protocormos em estágio 1, enquanto que para a transformação destes em plantas, tem-se empregado meios sólidos (PIERIK, 1990).

Um dos meios de cultura mais utilizados para propagação *in vitro* de Orchidaceae é a formulação de Murashige e Skoog (1962) com algumas adaptações tais como a variação da concentração de seus constituintes. O desenvolvimento de plantas de *Cyrtopodium paranaensi* (REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005) e de *Cyrtopodium punctatum* (DUTRA et al., 2009) foi maior em meio MS ½. Plantas de *Oncidium baueri* (SORACE et al., 2008) se desenvolveram melhor em meio MS ½, suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose enquanto que plantas de *Catasetum fimbriatum* (REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005) apresentaram igual desenvolvimento em meio MS e MS ½.

As citocininas são uma das classes de reguladores de crescimento mais utilizadas no cultivo *in vitro* (CALDAS et al., 1998), sendo necessárias para a divisão e diferenciação das células vegetais *in vitro* (TAIZ E ZEIGER, 2009), induzindo a morfogênese de orquídeas (PANT e SWAR, 2011). Portanto, o uso de reguladores de crescimento estimulam o processo de germinação e a formação de protocormos que antecede o desenvolvimento das plantas (SANTOS et al., 2007; PRADHAN e PANT, 2009; PANT e SWAR, 2011).

As variações genéticas dentro da família Orchidaceae podem resultar em respostas diferentes quanto ao desenvolvimento em relação ao uso de reguladores de crescimento (SANTOS et al., 2007), tornando-se importante investigar seus efeitos sobre a espécie estudada.

Em vista do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar os estádios de desenvolvimento inicial *in vitro* de *B. tuberculata* em resposta à utilização de BAP, época de maturação de frutos e tipos de polinização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2011.

Foram utilizados frutos de *B. tuberculata*, oriundos de polinização natural, autopolinização manual ou de polinização cruzada manual (para as duas últimas foram utilizadas oito políneas), produzidos por cinco plantas matrizes, com 12 anos de idade integrantes do acervo do orquidário da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD e colhidos aos 60, 90, 120, 150, 180 ou 210 dias após polinização (DAP). Em cada época de colheita foram utilizados três frutos de cada tipo de polinização.

Após serem colhidos os frutos foram lavados com água e detergente neutro, desinfestados com álcool etílico comercial (70%). A seguir os frutos de cada tipo de polinização foram abertos, com auxílio de estilete, e as sementes foram removidas das cápsulas, homogeneizadas respeitando-se cada tipo de polinização, e 0,005 g de sementes foram separadas e submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade. Após a confirmação da viabilidade, 0,05 g de sementes foram transferidas para Becker de 300 mL, sendo utilizado um Becker para cada tipo de polinização.

Em seguida as sementes foram embebidas em água destilada estéril, por 15 minutos. Após este período a água de embebição foi descartada e as três suspensões de sementes foram transferidas para ambiente asséptico onde foram desinfestadas, por 15 minutos, com solução composta de 3 mL de hipoclorito de sódio (2,5%) e 6 mL de água estéril. Na sequência, a solução de desinfestação foi descartada e, cada uma das suspensões de sementes foi submetida à tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após a tríplice lavagem as suspensões foram diluídas para 120 mL de água estéril para a realização da semeadura *in vitro*.

O meio de cultura utilizado foi Murashige e Skoog (1962) na metade da concentração de seus componentes ($MS \frac{1}{2}$), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e das concentrações de BAP (0,0; 0,1; 1,0 ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) com o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ com KOH (1M) e desprovido de agente geleificante. Foram utilizados como frascos de cultivo recipientes de vidro, com capacidade para 600 mL, providos de tampa metálica, que após receberem 60 mL de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$ por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu 2000 μL de uma das suspensões de sementes. Na sequência os frascos foram tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Após 150 dias da semeadura as estruturas vegetais foram avaliadas, segundo a classificação proposta por Suzuki et al. (2009) em: a) estágio 1 = protocormo intumescido clorofilado, b) estágio 2 = plantas com formação da primeira folha, c) estágio 3 = plantas com duas ou mais folhas e d) estágio 4 = plantas com folhas e uma ou mais raízes. Foi contabilizado também o número de estruturas vegetais mortas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjos em esquema de parcelas sub-subdividas. Foram alocadas na parcela, os tipos de polinização, nas sub-parcelas as doses de BAP e nas sub-subparcelas o período de maturação dos frutos, sendo realizadas três repetições de um frasco de cultivo cada. As variáveis, expressas em porcentagem, foram transformadas por meio da função $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetidas à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). Havendo significância, os fatores qualitativos foram comparados por teste de médias (Tukey até 5% de probabilidade) e os quantitativos por regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de orquídeas em geral, apresentam um padrão uniforme de desenvolvimento durante a germinação e desenvolvimento inicial (ARDITTI, 1992). Inicialmente, ocorre o intumescimento do embrião, que se desenvolve em uma estrutura redonda verde chamada de protocormo (estágio 1), em seguida, o protocormo se alonga

e dá origem à primeira folha (estádio 2) e uma segunda folha (estádio 3). Na sequência, ocorre a formação e desenvolvimento das raízes, originando uma nova plântula (estádio 4) (SUZUKI et al., 2012). A presença de raiz indica o término do estágio de protocormo ou plântula (ALVAREZ E SAGAWA, 1965).

Aos 150 DAP apenas as sementes dos frutos oriundos de polinização natural (PN) ou de cruzada manual (PC) ao serem transferidas para os meios de cultura germinaram e produziram protocormos e, o resumo das análises de variância com a significância ou não dos fatores analisados bem como a média geral das variáveis analisadas, a partir desse período, são apresentados no (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância do número de protocormos (N°P) e das porcentagens de protocormos nos estádios 1 (%P1), 2 (%P2), 3 (%P3) e 4 (%P4) e de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook. em função do tipo de polinização (POL), concentrações de BAP (BAP) e dias após a polinização (DAP)

FV	GL	Quadrados médios					
		N°P	%P1	%P2	%P3	%P4	%PM
POL	1	48,43**	40,86**	25,37**	13,01*	10,95*	18,58**
Erro 1	4	0,86	0,61	0,36	0,75	0,54	0,60
BAP	3	1,51 ^{ns}	50,78**	6,48**	11,28**	15,23**	6,89**
POL x BAP	3	3,34*	11,03**	3,15*	5,87**	3,17**	6,73**
Erro 2	16	0,67	0,60	0,83	0,90	0,59	0,55
DAP	2	87,27**	17,73**	0,80 ^{ns}	0,25 ^{ns}	2,87*	47,97**
POL x DAP	2	91,61**	1,70 ^{ns}	7,49**	0,77 ^{ns}	8,70**	0,05 ^{ns}
BAP x DAP	6	7,76**	5,25**	1,11*	4,66**	1,26 ^{ns}	4,63*
POL x BAP x DAP	6	11,05**	0,67 ^{ns}	0,34 ^{ns}	3,67**	3,78**	5,31*
Erro 3	28	0,53	0,92	0,44	1,02	0,69	1,70
CV(%)		8,08	18,88	12,89	22,29	42,28	35,58
M. Geral		87,93	29,72%	27,21%	21,81%	4,98%	16,25%

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

Houve efeito conjunto dos três fatores estudados ($p < 0,01$) sobre o número de protocormos (N°P), sobre a porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), 4 (%P4) e protocormos mortos (%PM).

A interação entre os tipos de polinização (POL) com os dias após a polinização (DAP) ($p < 0,01$) foi registrada sobre o número total de protocormos (PT) e sobre a porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2) e 4 (%P4). A combinação das concentrações de BAP com DAP foi significativa ($p < 0,05$) para todas as variáveis, exceto para a porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4).

3.1- Frutos colhidos aos 150 DAP: O maior N°P (123,2) foi observado com a utilização de PC e na ausência de BAP, sendo que o aumento das concentrações desse fitorregulador ocasionou efeito decrescente sobre esta variável. O N°P formados pela PN foi em média 21,4, não sendo influenciado pelas concentrações de BAP. Para frutos neste estágio de maturação fisiológica o número de protocormos oriundos de PC foi superior ao da PN para todas as concentrações de BAP estudadas (Figura 1A).

A maior formação de protocormos observada com a utilização de PC pode estar relacionada à maior quantidade e à melhor qualidade de pólen utilizado (TREMBLAY et al., 2005; CHAUTÁ-MELLIZO et al., 2012). Quanto maior a carga de pólen, maior é o nível de competição e por conta disso, a formação de tubos polínicos pode ser acelerada, aumentando a probabilidade de que um gametófito masculino alcance a fertilização e gere uma prole com maior qualidade genética e vigor (NIESENBAUM, 1999).

No presente trabalho, a quantidade de políneas utilizadas para PC não variou, sendo depositadas 8 políneas nos estigmas das flores. Por outro lado, sob condições naturais de polinização, esta quantidade pode ter variado resultando em menor formação de protocormos quando comparada à PC, uma vez que nem sempre toda a quantidade de políneas presente em um polinário é necessariamente depositada em um único evento de polinização, e a políneas pode ter sido desintegradas durante a deposição (PACINI e HESSE, 2002).

Além da quantidade, a qualidade do pólen também pode ter influenciado os resultados observados. Segundo Tremblay et al. (2005), sob condições naturais, a baixa quantidade de pólen pode limitar a produção de sementes em orquídeas, entretanto, em plantas auto-compatíveis, a ocorrência de auto-polinizações reduz a qualidade do pólen e proporciona reduções na produção de sementes, podendo, entretanto, não refletir na frutificação. Embora no presente trabalho a viabilidade das sementes não tenha sido mensurada, não se descarta a possibilidade de ocorrência de alguns frutos originados a partir de autopolinizações, os quais explicariam a menor produção de protocormos observada.

A adição de BAP ao meio de cultura mostrou não ser necessária para a formação de protocormos de *B. tuberculata*, uma vez que os maiores valores de N°P foram obtidos na ausência deste fitorregulador. Segundo Arditti e Ernst (1984), as sementes de orquídeas podem sintetizar quantidade suficiente de citocininas para satisfazer sua demanda para a germinação. Nesse sentido, provavelmente o conteúdo

endógeno de citocininas de sementes de *B. tuberculata*, neste estágio de maturação, tenha sido suficiente para a germinação e formação de protocormos.

Em relação ao desenvolvimento dos protocormos, tanto os tipos de polinização quanto as concentrações de BAP influenciaram os resultados obtidos (Figura 1).

A maior %P1 (91%) foi observada com a utilização de PN e com 1,8 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que %P1 igual a 35,5% foi registrada para PC em concentrações de BAP superiores a 0,1 mg L⁻¹ (Figura 1B).

As concentrações de BAP não influenciaram ($p>0,05$) a %P2 oriundos de PC que apresentou valor médio de 37,3%, enquanto que a maior %P2 (23,8%) oriunda de PN foi observada na ausência de BAP, havendo decréscimo desse valor com o aumento das concentrações de BAP (Figura 1C).

A maior %P3 foi observada na ausência de BAP, para os dois tipos de polinização estudados. A PC propiciou a formação de 43,5% e a PN de 25,0% de P3. Para a PN, houve decréscimo na %P3 com o aumento das concentrações de BAP (Figura 1D).

A maior %P4 (25,1%) foi obtida de frutos oriundos de PN na ausência de BAP, sendo que o aumento das concentrações desse fitorregulador ocasionou efeito decrescente sobre esta variável. Frutos provenientes de PC apresentaram valores médios de P4 igual 0,8%, não diferindo estatisticamente em função das concentrações de BAP (Figura 1E).

Para frutos oriundos de PN e PC, colhidos aos 150 DAP, não foram observadas diferenças estatística ($p>0,05$) sobre a %PM (média de 3,2% e 6,3%, respectivamente) com o aumento das concentrações de BAP (Figura 1F).

Como foi observado, a maior produção de protocormos em estágio 3 obtida com a utilização de PC pode ser um indicativo de maior vigor proporcionado por este tipo de polinização quando comparado com a PN na qual houve maior número de protocormos em estágio 1. A PC, por ser realizada de forma controlada, provavelmente favoreceu o aumento do vigor dos protocormos e dessa forma, é provável que a quantidade e a qualidade do pólen utilizado são fatores importantes na formação, no desenvolvimento e na diferenciação dos tecidos dos protocormos de *B. tuberculata*.

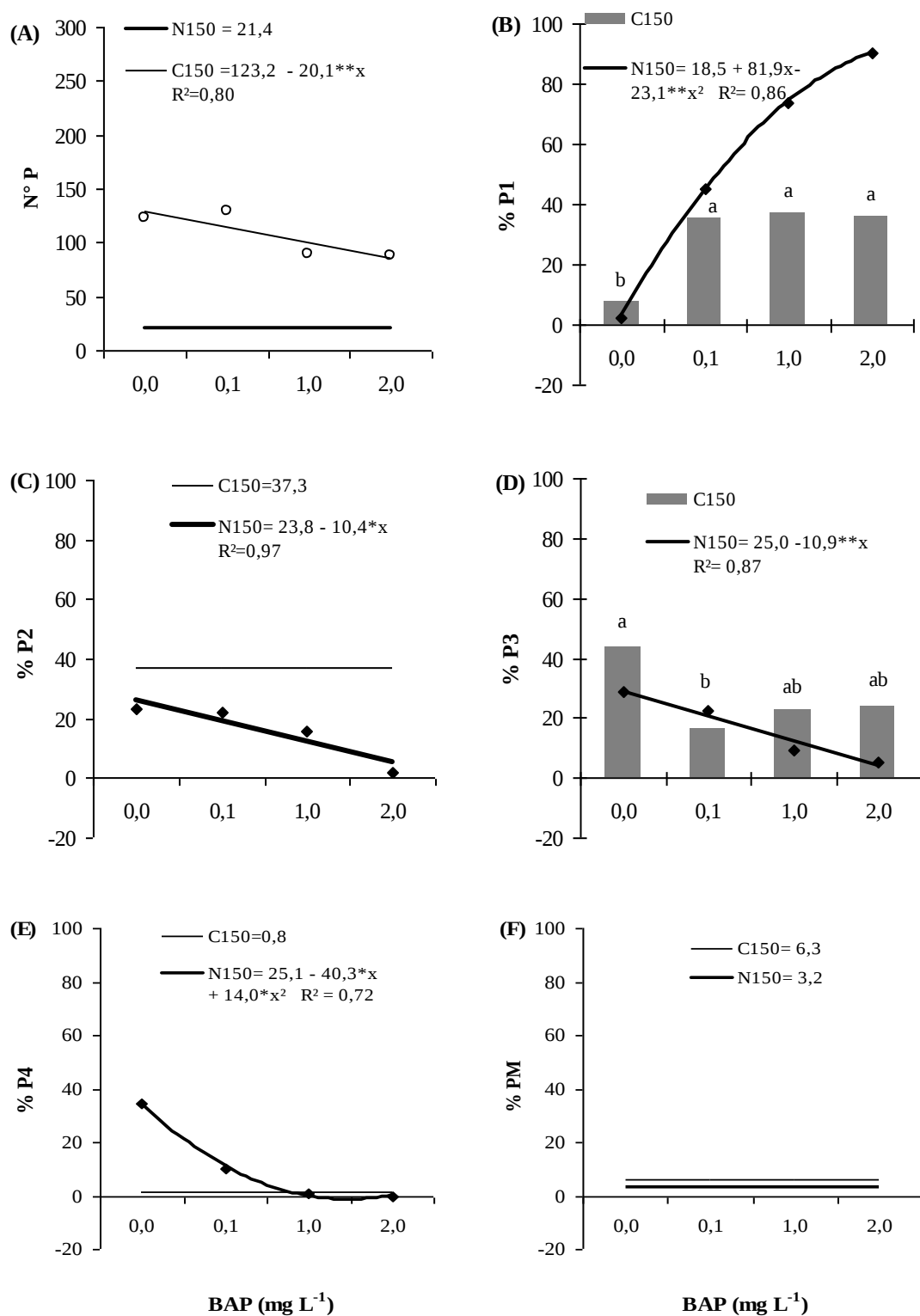


FIGURA 1. **(A)** Número total de protocormos (N°P), **(B)** Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P1), **(C)** porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), **(D)** porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), **(E)** porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e **(F)** porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 150 DAP em função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013.

Para sementes de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro, provenientes de polinização cruzada, coletada aos 240 DAP, e cultivadas por 120 e 180 dias em meio MS, a maior parte dos protocormos permaneceu no estágio 1, não sendo observado plântulas no estágio 4 (SUZUKI et al., 2009). Para sementes de *Cattleya bicolor* Lindley, provenientes de polinização cruzada, coletadas aos 240 DAP, cultivadas por 120 dias, a maior parte dos protocormos encontravam-se nos estádios 2 e 3, e aos 180 dias, eram distribuídos nos estádios 2, 3 e 4 (SUZUKI et al., 2010).

Por outro lado, a adição de BAP não resultou em estímulo no desenvolvimento de protocormos para PC e retardou o desenvolvimento dos protocormos quando se utilizou a PN. Para sementes de *Dendrobium longicornu* Lindl. e *D. formosum* Roxb. a incorporação de BAP ao meio de cultura também não teve efeito significativo no desenvolvimento de protocormos de ambas espécies (DOHLING et al., 2008). Sementes oriundas de PN, coletadas 150 DAP, tendem a formar, após 150 dias de cultivo, protocormos no estágio P1 (91,0%), com a utilização de $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, e formar protocormos no estágio P4 (25,1%), quando não se utiliza BAP. Sementes oriundas de PC, coletadas no mesmo período apresentam tendência a formar maior %P3 (43,5%), na ausência de BAP, entretanto o tempo de cultivo de 150 dias não foi suficiente para a formação expressiva de estruturas P4 (0,8%) (Figura1).

3.2- Frutos colhidos aos 180 DAP: O maior N°P (255,0) foi observado com a utilização de PN, cultivados em meio MS $\frac{1}{2}$, acrescido de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. O maior N°P formados pela PC (134,8), foi obtido com a concentração de $0,86 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e a ausência do fitorregulador propiciou maior N°P, em relação à PN (Figura 2A).

A adição de BAP no meio de cultura influenciou a formação de protocormos em ambos os tipos de polinização, provavelmente, em função do menor conteúdo endógeno de citocininas das sementes, o que resultou em maior demanda por fornecimento externo. Para sementes oriundas de PC a concentração mínima de BAP foi suficiente para estimular a germinação e formação de protocormos. Por outro lado, as sementes oriundas de PN tiveram menor sensibilidade ao BAP apresentando maior germinabilidade e conseqüente formação de protocormos, somente com o aumento da concentração deste fitorregulador.

O decréscimo nos níveis endógenos de citocinina pode estar relacionado a condições ambientais adversas (HARE et al., 1997), sendo a disponibilidade e a fonte de nitrogênio um fator limitante da produção deste hormônio (MERCIER e KERBAUY, 1991). Nesse sentido, é possível que alterações na disponibilidade de

nutrientes, principalmente de nitrogênio, tenha refletido nos resultados obtidos neste período de maturação, resultando em variação na produção de citocininas. Além disso, outros fatores podem ter alterado o status fisiológico e nutricional das plantas matrizes de maneira que frutos obtidos de PN apresentaram sementes com menor conteúdo de citocininas, quando comparados com sementes obtidas de PC.

As concentrações de BAP não influenciaram ($p>0,05$) a %P1, de PC, apresentando valor médio de 21,4%, enquanto que na PN, as concentrações de BAP promoveram aumento na %P1, sendo maior valor, 56,5%, obtido com o uso de 1,4 mg L⁻¹ de BAP. A %P1 observada na PC foi superior à natural até a concentração de 0,07 mg L⁻¹ de BAP (Figura 2B).

A %P2 oriundas dos dois tipos de polinização não foram afetadas ($p>0,05$) pelas concentrações do fitorregulador, e apresentaram médias de 33,3% (PC) e 21,5% (PN) (Figura 2C). As maiores %P3 observadas na PC (37,2%) e PN (28,3%) foram obtidas na ausência de BAP, sendo que o aumento das concentrações desse fitorregulador ocasionou efeito decrescente sobre esta variável (Figura 2D).

A %P4 oriunda de PC apresentou valor médio de 2,0%, não sendo influenciada pelas concentrações de BAP. A PN propiciou %P4 igual a 20,2% quando as sementes foram cultivadas na ausência do fitorregulador, sendo que doses maiores acarretaram redução nos valores de %P4 (Figura 2E).

A partir desta análise, pode-se observar que o desenvolvimento de protocormos seguiu o mesmo padrão observado com frutos colhidos aos 150 DAP. Para frutos oriundos de PC, houve maior formação de protocormos em estágio 3 enquanto que para PN a adição de BAP retardou a formação de protocormos, sendo obtido maior percentual de protocormos em estágio 1.

A %PM oriundos de PC não foi afetada pelas doses de BAP, apresentando valor médio de 20,0%, enquanto que a maior %PM da PN foi registrada com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP (30,0%) e a menor (2,8%) na ausência do fitorregulador (Figura 2F).

De maneira muito análoga às sementes coletadas aos 150DAP, sementes oriundas de PN, coletadas aos 180 DAP, apresentaram tendência a formar maiores %P1 (56,5%), com a utilização de 1,4 mg L⁻¹ de BAP, e formar maiores %P4, na ausência desse fitorregulador. Em PC, a maior parte dos protocormos permaneceram no estágio 3 de desenvolvimento, (cultivados na ausência de BAP), e com a formação reduzida de protocormos no estágio 4 de desenvolvimento (Figura 2).

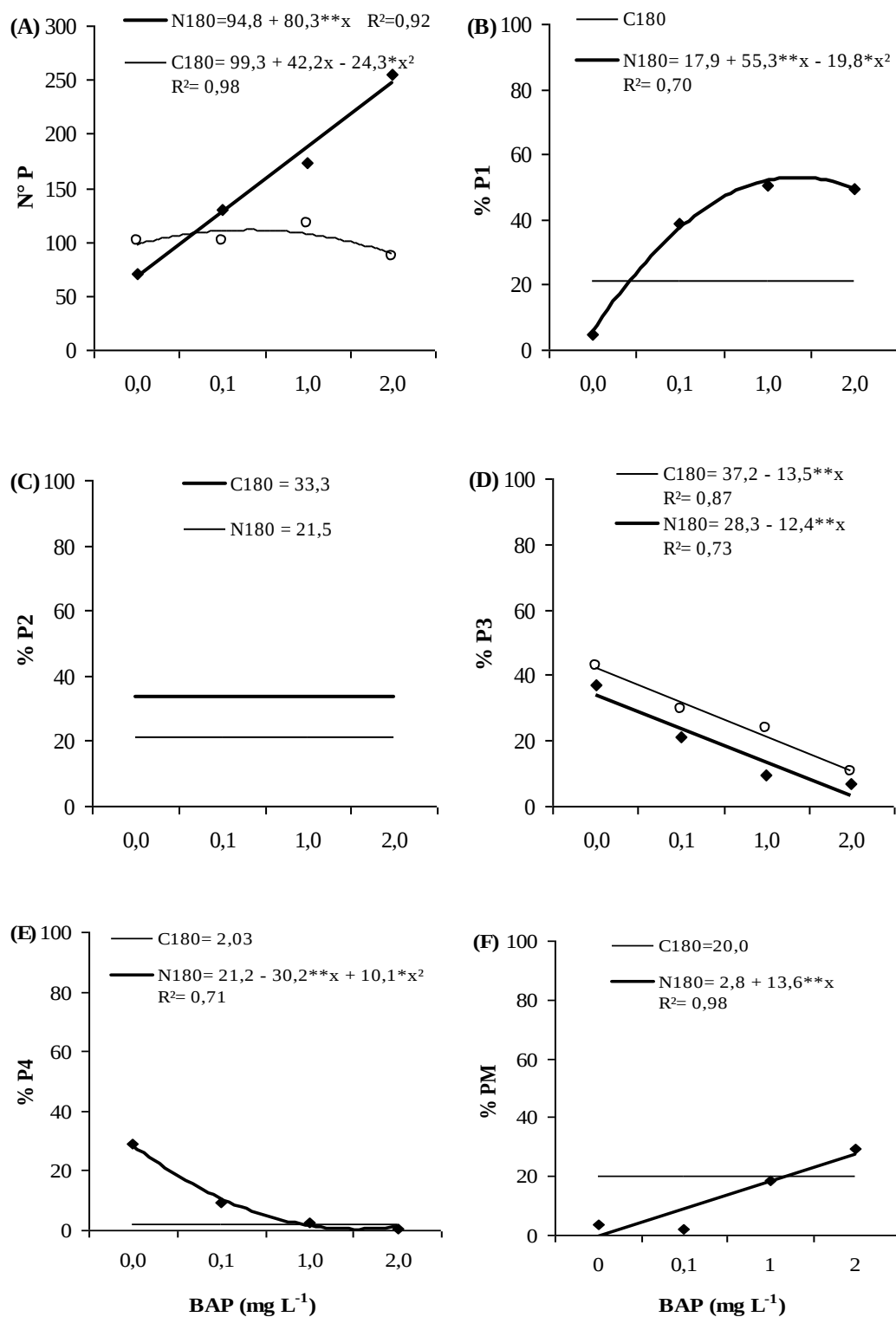


FIGURA 2. (A) Número total de protocormos (N°P), (B) Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P), (C) porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), (D) porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), (E) porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e (F) porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 180 DAP em função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013.

3.3- Frutos colhidos aos 210 DAP: A PN apresentou maior N°P (86), quando as sementes foram cultivadas em meio isento de BAP. Na PC, as concentrações de BAP promoveram aumento linear crescente no número de protocormos, com o maior número (105) registrado com a utilização da maior concentração 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Para frutos nesse estágio de maturação fisiológica, concentração de BAP igual ou superior a 0,1 mg L⁻¹ propiciaram formação de maior número de protocormos em frutos oriundos de PC, do que naqueles oriundos de PN (Figura 3A).

A adição de BAP foi efetiva na formação de protocormos de frutos oriundos de PC proporcionando maior formação de protocormos quando comparada aos resultados obtidos para PN. Como já discutido anteriormente, provavelmente neste estágio de maturação dos frutos, a demanda pelo fornecimento de citocininas externas é maior.

A %P1 de PC, não foi afetada ($p>0,05$) pelas concentrações de BAP, apresentando valor médio de 9,5%. A PN, promoveu aumentos lineares na %P1, com as concentrações de BAP, sendo registrado a maior %P1, 53,8% na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. A %P1 de PC foi praticamente inferior à PN em todas as concentrações de BAP estudadas (Figura 3B).

Na PC, a %P2 não foi influenciada ($p>0,05$), pelas concentrações de BAP, apresentando valor médio de 27,8%. A maior de %P2 (32,6%) observada na PN, foi verificada na ausência de BAP, decrescendo à medida que as concentrações de BAP aumentaram. A %P2 da PN foi maior que a PC até a dose de 0,7 mg L⁻¹ de BAP (Figura 3C).

A maior %P3 (34,6%) foi observada na PC, na ausência de BAP, decrescendo com o aumento das concentrações desse fitorregulador. Na PN, o maior valor de %P3 (36,4 %) foi registrado na concentração 0,1 mg L⁻¹ e o menor na concentração 0,0 mg L⁻¹ (Figura 3D).

As concentrações de BAP, não influenciaram ($p>0,05$) a %P4, na PN que apresentou valor médio de 0,9%, enquanto que na PC, o maior valor (13,8%) de %P4 foi observado na ausência de BAP, não diferindo estatisticamente nas demais concentrações estudadas (Figura 3E).

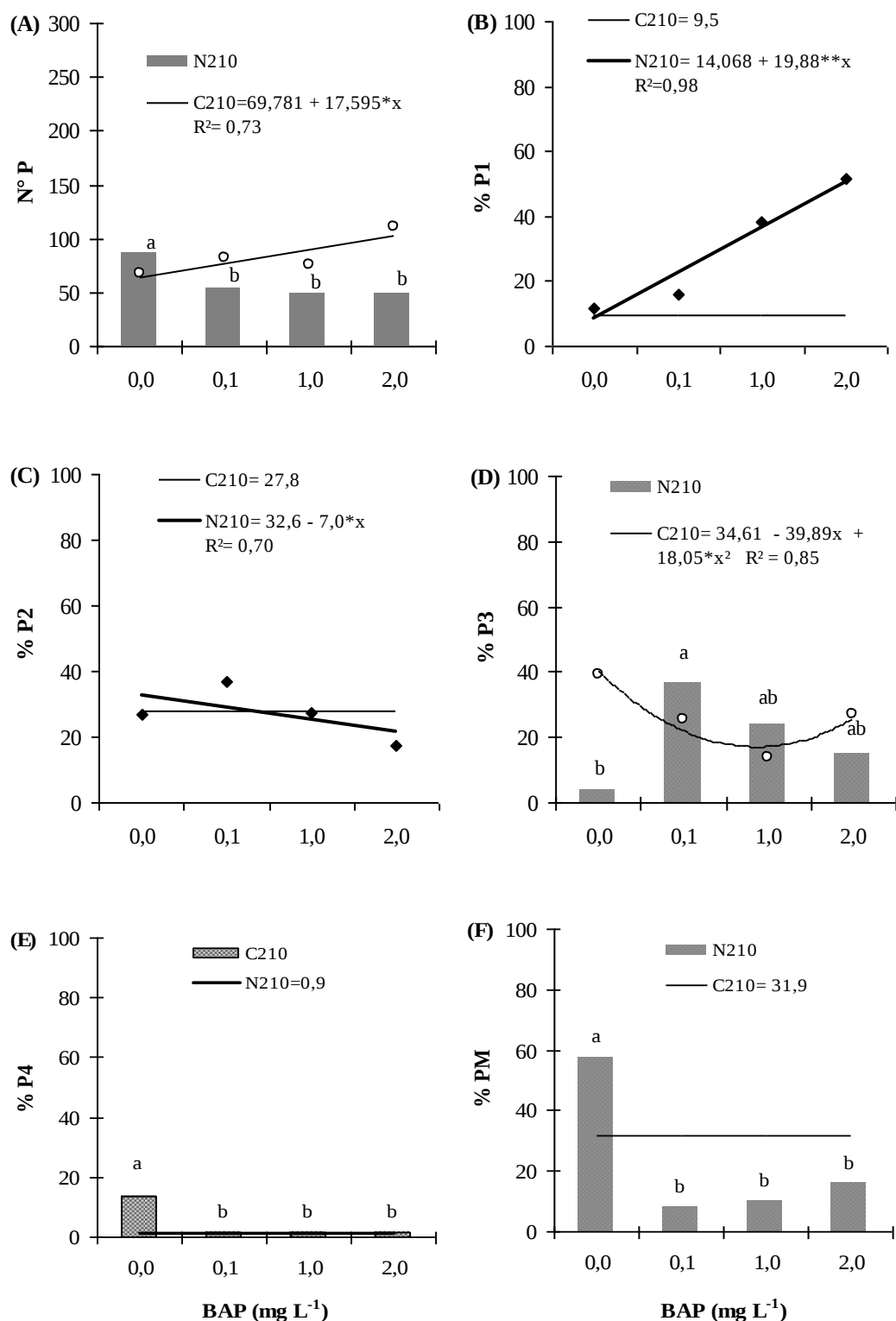


FIGURA 3. (A) Número total de protocormos (N°P), (B) Porcentagem de protocormos em estágio 1 (%P), (C) porcentagem de protocormos em estágio 2 (%P2), (D) porcentagem de protocormos em estágio 3 (%P3), (E) porcentagem de protocormos em estágio 4 (%P4) e (F) porcentagem de protocormos mortos (%PM) de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos de frutos colhidos aos 210 DAP em função das concentrações de BAP. Dourados, UFGD, 2013.

A polinização cruzada artificial foi eficiente na formação e no desenvolvimento de protocormos provavelmente pelo maior vigor proporcionado tanto pela qualidade, quando pela quantidade de pólen utilizado. Com a utilização de PC, elevada formação de protocormos em estágio 3 foi obtida em comparação com a PN, a qual resultou em todos os períodos de maturação dos frutos, um desenvolvimento lento com elevada formação de protocormos em estágio 1.

A maior %PM (57,6%) foi observada na PN, na ausência de BAP, e as demais concentrações não apresentaram diferenças estatísticas. A %PM da PC não foi afetada ($P>0,05$) pelas concentrações de BAP, apresentando valor médio de 31,9%. A PC apresentou %PM maior que a PN quando cultivados em concentrações de BAP igual ou superior a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 3F).

A PN, aos 210 DAP, tende a formar maiores %P1, com a utilização da concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, não sendo observado a formação expressiva de protocormos em estágio 4 de desenvolvimento. A PC tende a formar maior %P3, (43,4%) e %P4 (13,8%), na ausência da BAP (Figura 3).

De maneira geral, a adição de BAP em concentrações superiores a $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, propicia a formação de P1, em sementes oriundas de PN, entretanto esses valores tendem a diminuir à medida que o período de maturação dos frutos aumenta. Essas estruturas desenvolvem-se até P4, na ausência de BAP, sendo também observados valores decrescentes à medida que o tempo de coleta aumenta, apresentando comportamento indiferente aos 210 DAP, em relação ao BAP (Figura 4A).

Independente da época de coleta dos frutos, em sementes oriundas de PC, após 150 dias de cultivo, existe tendência a formação de 40% de P3, na ausência de BAP. Em relação à formação de P4 o tempo de coleta de frutos influenciou a formação dessas estruturas. À medida que o tempo de coleta aumentou, houve aumento na %P4, sendo que aos 210 DAP os valores registrados foram 13,8%, obtidos na ausência de BAP (Figura 4B).

O desenvolvimento de protocormos de diversas espécies de orquídeas varia de acordo o meio de cultura e estágio de maturação dos frutos. Aos 120 dias de semeadura *in vitro* de *Hoffmannseggella cinnabarina*, provenientes de polinização cruzada, coletadas aos 180 e 210DAP, a adição da BA, no MS favoreceu a formação de protocormos no estágio 1 e 3 (SUZUKI et al., 2012). Aos 180 dias da semeadura *in vitro* de *Beclardia macrostachya*, provenientes de sementes de polinização cruzada, coletadas aos 60DAP, concentrações menores de BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), adicionada ao meio

MS $\frac{1}{2}$, favoreceram o desenvolvimento de protocormos e a formação de plântulas (BHOYROO et al., 2011).

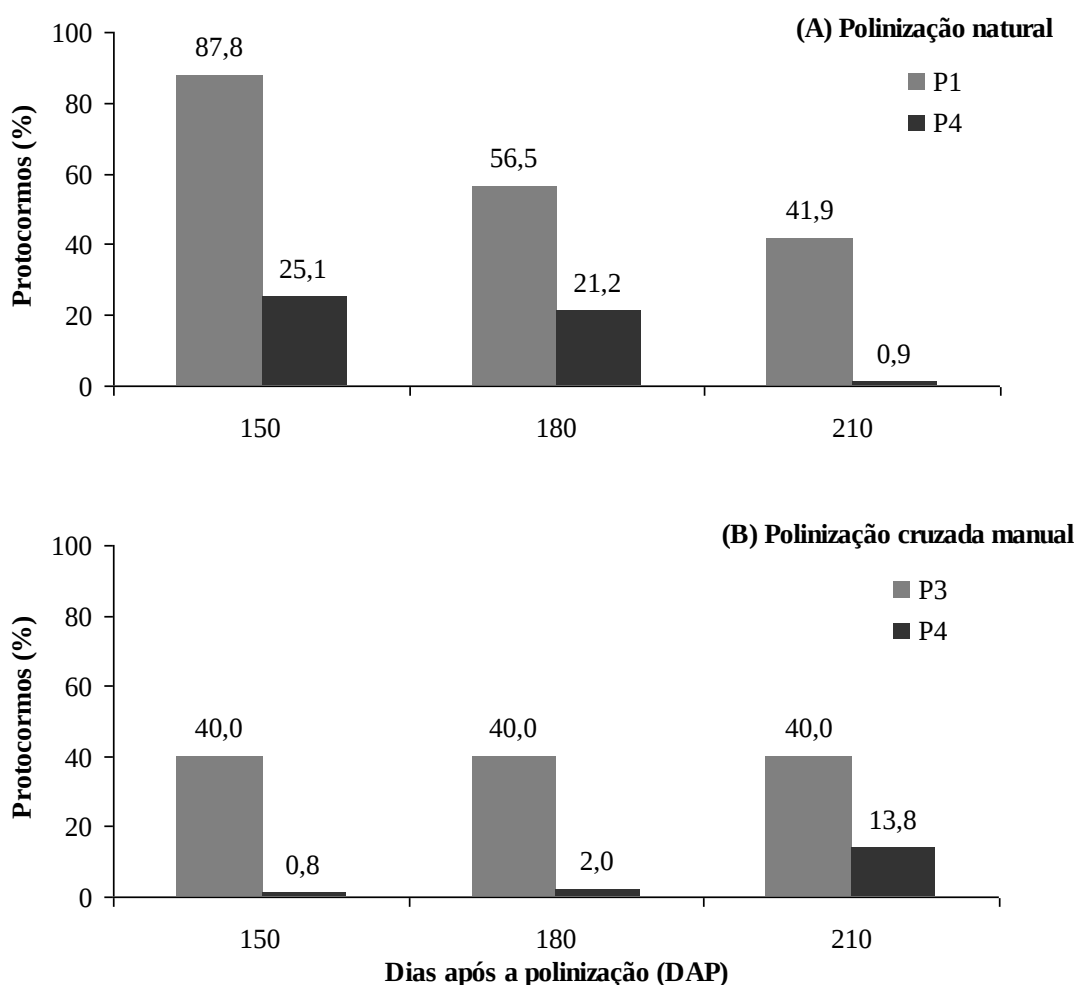


FIGURA 4. Porcentagem de protocormos *Brassavola tuberculata* Hook., **(A)** oriundos de polinização natural (PN); **(B)** oriundos de polinização cruzada manual em função dos épocas de coleta dos frutos. Dourados, UFGD, 2013.

Em ambas as polinizações, a formação de maior número de protocormos ocorreu quando os frutos foram colhidos aos 180 DAP (Figura 5). Para essa época de coleta, a PN, apresentou maior número de protocormos na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Figura 2A), enquanto que para frutos colhidos aos 210 DAP o maior número de protocormos foi obtido na ausência de BAP (Figura 3A), e para frutos colhidos aos 150 DAP não houve efeito do BAP sobre o número de protocormos (Figura 1A).

Na PC, o número de protocormos foi semelhante em frutos coletados aos 150 e 180 DAP (Figura 5), quando foram utilizadas as concentrações $0,0$ e $0,86 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Figuras 1A, 2A), respectivamente, apresentando um comportamento

decrecente aos 210 DAP, na maior concentração de BAP utilizada (Figura 3A).

Embora a PN favorecesse a formação de protocormos em estágio 4 (plantas completas) nos períodos de polinização estudados, a baixa formação de protocormos observada com a utilização desta polinização aos 150 e 210 DAP, permite sugerir que fatores relacionados à polinização e às condições ambientais podem reduzir o potencial germinativo e conseqüentemente o recrutamento de novas plantas. Sob condições naturais, estes resultados geram preocupações em relação à manutenção das populações naturais e ao seu status de conservação. Por outro lado, os elevados valores de N°P obtidos aos 180 DAS com a adição de BAP podem servir para estudos sobre germinação e produção de mudas desta espécie.

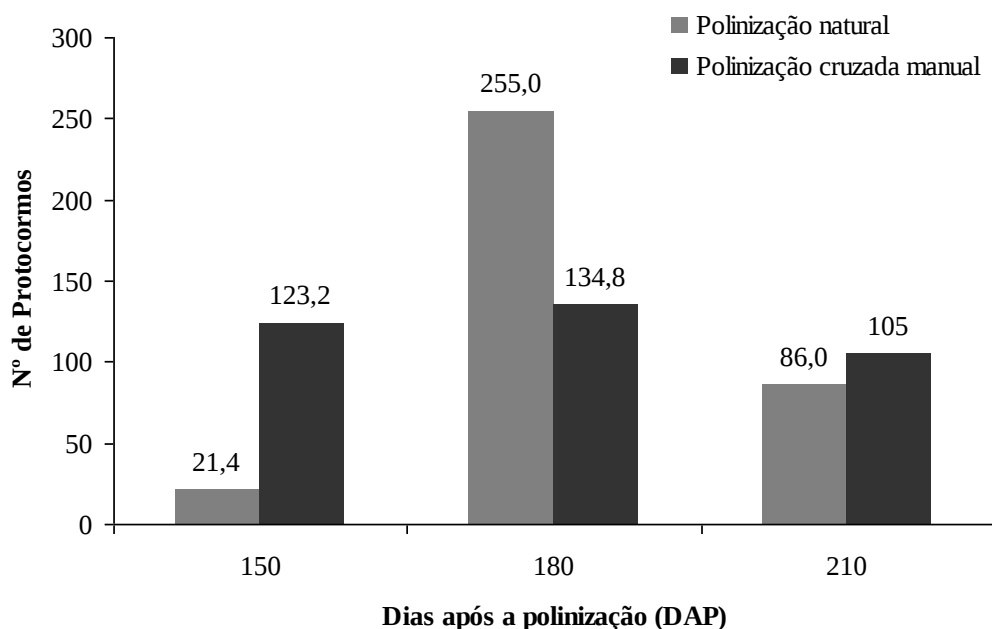


FIGURA 5. Número de protocormos de *Brassavola tuberculata* Hook., oriundos polinização natural e de polinização cruzada manual em função dos épocas de coleta dos frutos. Dourados, UFGD, 2013.

4. CONCLUSÃO

O número de protocormos da polinização cruzada manual e da polinização natural é maior em frutos coletados aos 180 dias após a polinização (DAP).

A porcentagem de protocormos no estágio 1 (%P1) formada pela polinização cruzada manual e polinização natural é maior em frutos coletados aos 150 dias após a polinização (DAP).

A porcentagem de protocormos no estágio 4 (%P4) é maior em frutos coletados aos 150 dias após a polinização (DAP) oriundos de polinização natural e, aos 210 dias após a polinização (DAP), naqueles oriundos de polinização cruzada manual.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, M. R.; SAGAWA, Y. A. histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 18, n. 2, p. 251-261, 1965.

ARAÚJO, A. G. de. Aplicação da cultura de tecidos para a multiplicação de espécies em extinção: o caso das orquídeas. In: Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, 3., 2012. Aracaju. Anais... Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2012. p. 17-22.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley, 1992. 691 p.

ARDITTI, J.; ERNST, R. Physiology of germinating orchid seeds. In: ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 177-222.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 21 out. 2013.

BATYGINA, T. B.; BRAGINA, E. A.; VASILYEVA, V. E. The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracov, v. 45, n. 2, p. 21-34, 2003.

BELLONE, R. **Orquídeas: Guía del aficionado**. Ediciones Omega. Barcelona. 2006. 544 p.

BHOYROO, V.; PUCHOOA, D.; SANMUKHIYA, V. M. An assessment of plant growth regulators on asymbiotic development and germination of immature embryos of *Beclardia macrostachya* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 2, p. 30-33, 2011.

CHAUTÁ-MELLIZO, A.; CAMPBELL, S. A.; BONILLA, M. A.; THALER, J. S.; POVEDA, K. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. **Basic and Applied Ecology**, Goettingen, v. 13, n. 6, p. 524-532, 2012.

DOHLING, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Optimization of nutrient requirements for asymbiotic seed germination of *Dendrobium longicornu* Lindl. and *D.*

formosum Roxb. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, Hannover, v. 74, n. 4, p. 167-172, 2008.

DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 235-243, 2009.

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

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T. de; RIBEIRO, J. P. N.; CASALI, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – a computer statistical analysis system**. Versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA. 2011.

FU, C. H.; CHEN, Y. W.; HSIAO, Y. Y.; PAN, Z. J.; LIU, Z. J.; HUANG, Y. M.; TSAI, W. C.; CHEN, H. H. Orchid Base: A collection of sequences of the transcriptome derived from Orchids. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 238-243, 2011.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. Dordrecht: Springer. 2008. p. 1-28.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, n. 1, p. 79-103, 1997.

KERBAUY, G. B.; CHAER, L. Micropropagação comercial de orquídeas: Conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1 Ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 177-205.

LUAN, V. Q.; THIEN, N. Q.; KHIEM, D. V.; NHUT, D. T. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture**. Nong Lam University Ho Chi Minh City. Vietnam, p, 175-177, 2006.

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**, California, v. 138, n. 2, p. 195-199, 1991.

MOHANTY, P.; PAUL, S.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB PLANTS**, Oxford, v. 2012, p. 1-8, 2012.

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

NIESENBAUM, R. A. Effect of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n.2, p. 261-268, 1999.

PACINI, E.; HESSE, M. Types of pollen dispersal units in orchids, and their consequences for germination and fertilization. **Annals of Botany**, Leicester, v. 89, n. 6, p. 653-664, 2002.

PANT, B.; SWAR, S. Micropropagation of *Cymbidium iridiodioides*. **Nepal Journal of Science and Technology**, Kathmandu, v. 12, p. 91-96, 2011.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3 ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PRADHAN, S.; PANT, B. *In vitro* seed germination in *Cymbidium elegans* Lindl. And *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. (Orchidaceae). **Journal of Plant Science**, Kathmandu, v. 6, p. 100-102, 2009.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; MANENTE-BALESTIERI, F. C. de L. Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb.f. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 335-341, 2010.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

REGO-OLIVEIRA, L. do V.; FARIA, R. T. de. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional cultura media and comercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. de P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. da C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **Iniciação Científica Cesumar**, Maringá, v. 09, n.1, p. 07-12, 2007.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.2, p. 185-191, 2012.

SORACE, M.; FARIA, R. T. de; JÚNIOR, C. V. D. GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, 2008.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Choron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 04, p. 657-666, 2009.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, New York, v. 48, n. 5, p. 500-511, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D.; ZIMMERMAN, J. K.; CALVO, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, n. 1, p. 1-54, 2005.

VENTURA, G. M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

CAPÍTULO III: EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES E CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Brassavola tuberculata* HOOK. (ORCHIDACEAE).

RESUMO

As ações antropogênicas limitam e reduzem a distribuição e a abundância de espécies de orquídeas na natureza, ameaçando sua preservação. A propagação de plantas e os bancos de sementes contribuem para a conservação da variabilidade genética destas espécies. Desta forma, nesse trabalho objetivou-se avaliar o tempo de armazenamento e as concentrações de ágar na germinação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook. Foram utilizadas sementes dessecadas por 14 dias e armazenadas por 0, 30, 60 ou 90 dias sob condições de refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. O meio de cultura foi MS $\frac{1}{2}$, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e ágar (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 ou 8 g L⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arranjos em esquema de parcelas sub-subdividas, sendo alocados nas parcelas os tempos de armazenamento e nas subparcelas as concentrações de ágar, com quatro repetições. Aos 30 dias após a semeadura foi avaliada a porcentagem de germinação, sendo os dados submetidos à análise de variância e de regressão. O emprego dos meios líquido e sólido favorecem a germinação de *B. tuberculata*. Sementes de *B. tuberculata* armazenadas por 90 dias apresentam germinação acima de 70%.

Palavras-chave: armazenamento de sementes, agente geleificante, orquídeas nativas.

EFFECT OF THE STORAGE TIME OF SEEDS AND CONSISTENCY OF CULTURE MEDIUM ON *IN VITRO* GERMINATION OF THE *BRASSAVOLA TUBERCULATA* HOOK. (ORCHIDACEAE)

ABSTRACT

The anthropogenic limit and reduce the distribution and abundance of species of orchids in nature, threatening its preservation. The plants propagation and seed banks contributes to the conservation of the genetic variability of these species. Thus, this work aimed to evaluate the storage time and the concentrations of agar *in vitro* germination of the *Brassavola tuberculata* Hook. Were used seed dried for 14 days and stored for 0, 30, 60 and 90 days under refrigeration at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. The culture medium was $\frac{1}{2}$ MS, supplemented with 30 g L^{-1} sucrose and agar (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 g L^{-1}). The experimental design was completely randomized, and treatments were arranged in sub-subdivided plots, the plots being allocated storage times and subplots concentrations of agar, with four replications. At 30 days after sowing was evaluated the germination percentage and the data submitted to analysis of variance and regression. The use of liquid and solid media favors the germination of *B. tuberculata*. Seeds of *B. tuberculata* stored for 90 days resulted in germination above 70%.

Palavras-chave: seed storage, gelling agent, native orchids.

1. INTRODUÇÃO

As orquídeas nativas brasileiras têm despertado grande interesse não apenas entre os colecionadores, mas também nos programas de melhoramento e de reintrodução das espécies em seus habitats. O gênero *Brassavola* possui características morfológicas que viabilizam a sua utilização na produção de híbridos duplos e triplos com *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronitis* e *Epidendrum* (SOARES et al., 2012).

Nesse gênero destaca-se a espécie *Brassavola tuberculata*, por apresentar inflorescências com duas a seis flores agrupadas, de coloração creme a verde claro, labelo largo e extremidade pontiaguda (BELLONE, 2006). Esta espécie é encontrada na mata atlântica, cerrado e caatinga (BARROS et al., 2013) e no estado de Mato Grosso do Sul (RECH et al., 2011).

Na natureza as orquídeas dependem da interação entre fatores bióticos e abióticos, que atuam em seu crescimento, desenvolvimento e sucesso reprodutivo, determinando sua sobrevivência. Nessas condições, ações antropogênicas limitam e reduzem a distribuição e a abundância dessas espécies, pela coleta de plantas ou alteração ambiental, ameaçando sua ocorrência natural (SWARTS e DIXON, 2009).

As orquídeas produzem frutos contendo milhares de diminutas sementes, com 0,005 a 6 mm de comprimento (ARDITTI, 1992), e na natureza sua germinação, por precisar de simbiose com fungos específicos apresentam baixa taxa de germinação (STOUTAMIRE, 1964).

Para a conservação destas espécies, a proteção *in situ* deve ser integrada a métodos de conservação *ex situ*, como a propagação de plantas e bancos de sementes (DOWLING e JUSAITIS, 2012). Desta forma, os bancos de sementes de orquídeas possibilitam o armazenamento de um grande número de sementes, a curto ou longo prazo (MACHADO NETO e CUSTÓDIO, 2005). Tanto o armazenamento de sementes como a manutenção a longo prazo de coleções ativas para conservação dos recursos genéticos (BERJAK e PANMENTER, 2008), são imprescindíveis para a produção de mudas *in vitro*, escalonadas em diferentes épocas do ano.

O desenvolvimento de condição adequada de armazenamento de sementes de algumas espécies de orquídeas pode reduzir a perda da viabilidade ou germinação. Um aumento na longevidade das sementes de orquídeas é obtido com a redução concomitante do teor de umidade das sementes e da temperatura de armazenamento (SEATON e HAILES, 1989).

A germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, tem se mostrado uma ferramenta eficiente para sua propagação (ZENG et al., 2012), pois resulta em maiores porcentagens de germinação, em relação a condições naturais. O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é um dos mais utilizados na germinação *in vitro* de orquídeas (SUZUKI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012). Segundo Ferreira (2012), por este meio apresentar altas concentrações de sais, concentrações mais reduzidas deverão ser testadas visando atender as necessidades nutricionais de cada espécie.

A redução das concentrações de sais do meio MS tem sido relatada por vários autores, para germinação de diferentes espécies de orquídeas. A concentração de sais no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) reduzida a 50% de macro e microelementos, promoveram melhor germinação de sementes de *Beclardia macrostachya* (BHOYROO et al., 2011), *Paphiopedilum wardii* Sumerrh (ZENG et al., 2012), *Bletia purpurea* (DUTRA et al., 2008), *Phragmipedium longifolium* e *Phragmipedium pearcei* (MUÑOZ e JIMÉNEZ, 2008), de híbridos de *Vanda* (JOHNSON e KANE, 2007) e de *Spathoglottis plicata* Blume (THAKUR e DONGARWAR, 2012).

Dependendo da espécie, o meio nutritivo para germinação assimbiótica de orquídeas pode ter consistência sólida ou líquida. Em meio sólificado, o ágar tem sido utilizado pela sua grande eficiência como agente geleificante, dando suporte ao desenvolvimento de plantas no meio de cultura (FARIA et al., 2006). No entanto, meios mais consistentes, com maior quantidade de ágar, poderão interferir na absorção de água e nutrientes pelas culturas (KUSUMOTO et al., 1980). O meio líquido apresenta a vantagem de redução de custos, maior facilidade no preparo e maior homogeneidade, além disso, requer menor concentração de sais em comparação ao meio sólido (PASQUAL, 2001).

Para espécies de orquídeas, estudos sobre a germinação têm sido relatados tanto em meios sólidos (STEWART e KANE, 2006; MUÑOZ e JIMÉNEZ, 2008; ABBAS et al., 2011; SCHWALLIER et al., 2011; MOHANTY et al., 2012; MAHENDRAN et al., 2013), quanto em meios líquidos (SHADANG et al., 2007; DUTRA et al., 2008; HOSSAIN et al., 2010; ABRAHAM et al., 2012). Desta forma, novos estudos sobre armazenamento de sementes e a germinação *in vitro* de *B. tuberculata* se fazem necessários para otimizar a conservação *ex situ* desta espécie.

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar o tempo de armazenamento e as concentrações de ágar na germinação *in vitro* de *Brassavola tuberculata* Hook.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2011.

Foram utilizados frutos de *Brassavola tuberculata* Hook, oriundos de polinização natural, produzidos por plantas do orquidário da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD e colhidos aos 210 dias após a identificação visual do sucesso da fecundação.

Os frutos foram lavados com água e detergente neutro e desinfestados com álcool (70%). A seguir foram abertos, com auxílio de estilete e as sementes foram removidas das cápsulas, homogeneizadas e três amostras de 0,005 g cada foram colocadas em tubos de ensaio recebendo 3 mL de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio 0,5%. As suspensões de sementes foram acondicionadas em ambiente desprovido de luz e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, após 24 horas, foram acrescidas de 7 mL de água destilada e agitadas, sendo pipetado 1 mL para identificação de sementes viáveis, em câmara de Peters, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (SOARES et al., 2012). Foram consideradas como viáveis as sementes com embriões totalmente coloridos de carmim, enquanto que as sementes com embriões incolores, parcialmente corados ou desprovidas de embrião foram consideradas inviáveis. Foram contabilizadas 388 sementes viáveis por miligrama de sementes.

Uma vez analisada viabilidade, o restante das sementes foi dividido em quatro porções de igual peso e transferidas para dessecador provido de sílica gel por 14 dias. Após esse período, a primeira porção (0,02 g) foi utilizada para a semeadura *in vitro* correspondendo ao tempo de armazenamento 0 dias [TA(0)], e as demais porções de igual peso foram armazenadas em frascos de polipropileno opaco, com tampa rosqueável, providos de sílica gel, e mantidos sob refrigeração a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 [TA(30)], 60 [TA(60)] e 90 dias [TA(90)].

Para a semeadura *in vitro*, foram utilizadas, sementes de cada tempo de armazenamento que, em ambiente estéril, foram embebidas em água destilada estéril

por 15 minutos. Na sequência, a água de embebição foi descartada e as sementes foram desinfestadas por 15 minutos com uma solução composta por 3 mL de hipoclorito de sódio comercial e 6 mL de água destilada estéril. Após esse período as sementes receberam tríplice lavagem com água destilada estéril (50 mL por lavagem). Após o descarte da água de lavagem as sementes receberam 120 mL de água destilada estéril para a realização da semeadura *in vitro*.

O meio de cultura utilizado foi Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de seus componentes (MS $\frac{1}{2}$), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e das concentrações de ágar bacteriológico (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 ou 8 g L⁻¹), com o pH ajustado para 5,8±0,1 com KOH (1M). Foram utilizados como frascos de cultivo recipientes de polipropileno transparentes, providos de tampa, com capacidade para 50 mL, e que após receberem 20 mL de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de 1,05 kg cm⁻² por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu 200 µL da suspensão de sementes. Após a semeadura os frascos foram tampados e as culturas acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 20,0 µmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada, permanecendo nessas condições por 30 dias.

Decorrido este período, os frascos foram abertos, a suspensão de sementes foi vertida em placa de Petri e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, contou-se o número total de sementes (N°TS) e o número de sementes com embriões clorofilados (N°SEC). A porcentagem de germinação (%G) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: % G = [(N°SEC x 100)/ N°TS](ROY et al., 2011).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os tratamentos foram arrançados em esquema de parcelas subdividida. Foram alocados na parcela, os tempos de armazenamento e na subparcela as concentrações de ágar, com quatro repetições de um frasco de cultivo.

A variável, porcentagem de germinação foi transformada por meio da função $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetida à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). Havendo significância aos fatores estudados foram ajustadas curvas de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância com a significância ou não dos fatores analisados bem como a média geral da porcentagem de germinação de *B. tuberculata* são apresentados no Quadro 1.

Houve efeito conjunto do tempo de armazenamento e das concentrações de ágar sobre a porcentagem de germinação (%G) da espécie, entretanto efeito significativo isolado dos fatores analisados só foi observado em relação ao tempo de armazenamento (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de *Brassavola tuberculata* Hook

F.V.	G.L.	Quadrados médios
		%Germinação
Tempo de armazenamento (TA)	3	6,81**
Erro a	12	0,03
Ágar	8	0,05 ^{ns}
TA x Ágar	24	0,09**
Erro b	96	0,04
CV (%)		2,18
Média geral		86,7%

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

^{ns} não significativo

Quando a semeadura foi efetuada imediatamente após o período de dessecação [TA(0)] a maior porcentagem de germinação (94,4%) foi observada com a utilização de 2,9 g L⁻¹ de ágar (Figura 1A). As sementes dessecadas por 14 dias e armazenadas por 30 dias [TA(30)], apresentaram viabilidade de 94% em todas as concentrações de ágar (Figura 1B). Segundo Seaton e Hailes (1989), a determinação da viabilidade inicial é um fator importante para determinar o período de armazenamento de sementes.

As sementes de *B. tuberculata* apresentaram de maneira geral, perda da viabilidade com o avanço do tempo de armazenamento. Sementes armazenadas por 60 dias [TA(60)] apresentaram um decréscimo na %G de 11% em relação àquelas armazenadas por 30 dias (Figura 1B, 1C) não sendo observado efeito da concentração do ágar nesses resultados. Entretanto, quando as sementes foram armazenadas por 90 dias [TA(90)], a porcentagem de germinação decresceu à medida que a concentração de

água aumentou, sendo o maior valor (80,1%) observado na ausência do geleificante, ou seja em meio líquido (Figura 1D). Tal comportamento pode indicar que as sementes não encontraram dificuldade em germinar em meios líquidos ou com baixas concentrações de ágar, devido à maior facilidade de absorção de água e nutrientes.

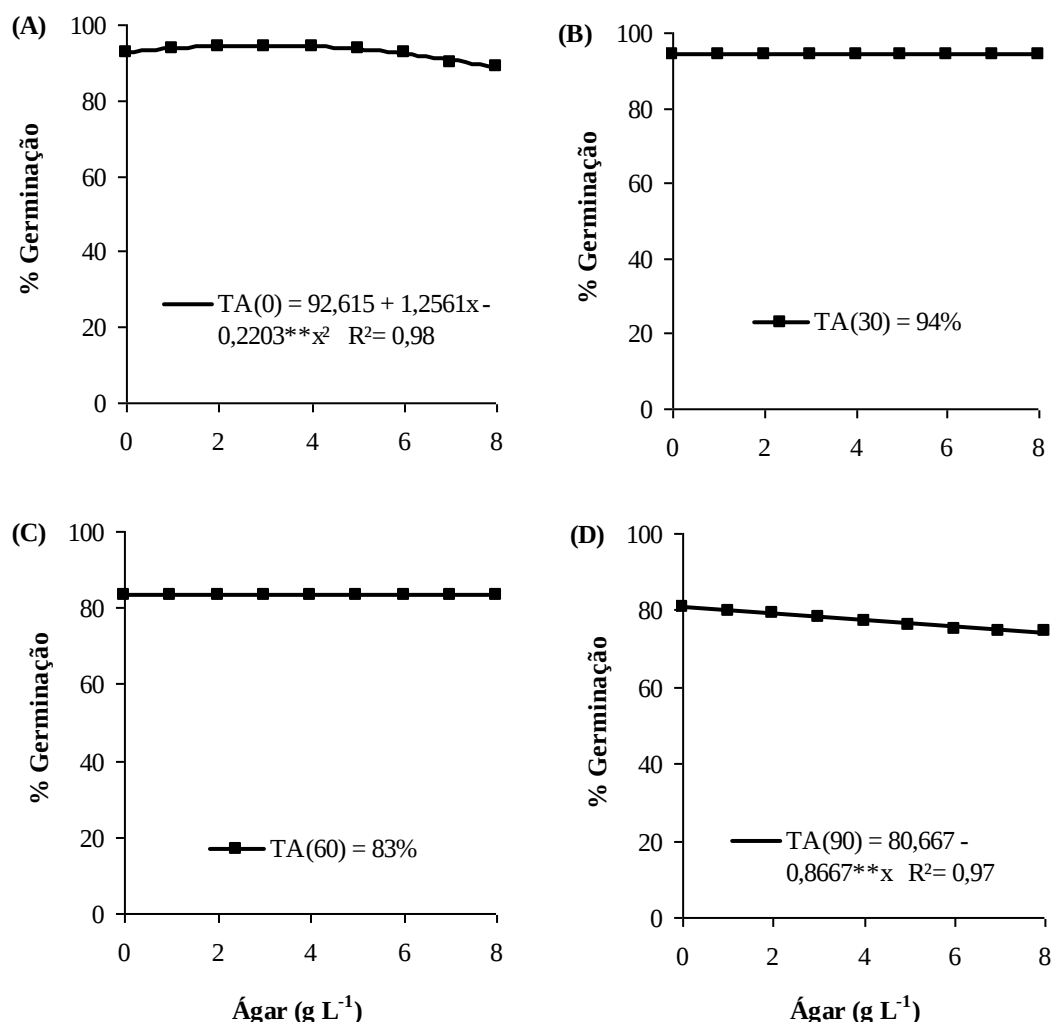


FIGURA 1. Porcentagem de germinação de *Brassavola tuberculata* Hook., nos tempos de armazenamento (TA): **(A)** zero dias; **(B)** 30 dias; **(C)** 60 dias; **(D)** 90 dias, em função das concentrações de ágar. Dourados, UFGD, 2013.

Na conservação de sementes de orquídeas, o teor de umidade das sementes e a temperatura de armazenamento, interferem nas reações bioquímicas que regulam o metabolismo de cada espécie (ALVAREZ-PARDO e FERREIRA, 2006; MARTINS e LAGO, 2008). Hirano et al. (2009), estudando a conservação de sementes de *Phaius tankervilleae*, observaram que em ausência de armazenamento a viabilidade foi de 76,9%, e armazenadas por 90 dias à 4°C, a viabilidade reduziu para 38,7%, com perda

de 38,3%, enquanto neste trabalho, a viabilidade inicial observada para *B. tuberculata* foi maior e a perda no armazenamento foi menor (14,3%), evidenciando que as condições de armazenamento foram favoráveis para a espécie, pois proporcionaram germinação superior a 70%.

Hosomi et al. (2012), estudando a preservação de nove espécies de *Cattleya* armazenadas a -18°C , observaram que a maioria das espécies aos 35 dias de armazenamento apresentaram alta viabilidade, com germinação variando de 96% à 99%, exceto as espécies *C. tenuis* (73%) e *C. mossiae* (68%), enquanto *B. tuberculata* quando armazenadas a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 dias, apresentou 94% de germinação, indicando que a viabilidade das sementes durante o armazenamento, pode ser preservada quando as condições de conservação são favoráveis.

Aos 90 dias de armazenamento sementes de *B. tuberculata* apresentaram alta viabilidade (80,1%), corroborando com a afirmação de Alvarez-Pardo e Ferreira (2006), que avaliando diferentes condições e período de armazenamento de semente de *Cattleya intermédia*, observaram alta viabilidade (98%) por até seis meses, exceto quando mantidas fora do dessecador em ambiente natural.

Mweetwa et al. (2008), avaliando a germinação de sementes de *Phalaenopsis* Sogo Lit-Angel e *Phalaenopsis* spp. linhagem 9450, armazenadas a 4°C por 90 dias, observaram viabilidade abaixo de 50% (46% e 23%, respectivamente), em meio líquido, enquanto para sementes de *B. tuberculata*, dessecadas por 14 dias e armazenadas nas mesmas condições foi superior, em torno de 80% de germinação. A porcentagem de germinação observada para *B. tuberculata* em meio MS $\frac{1}{2}$ com 4 g L^{-1} de ágar, com 30 dias de armazenamento a 4°C , ou não, ficou acima de 90%, enquanto, Suzuki et al. (2009, 2010), avaliando a germinação em meio MS, com 4 g L^{-1} de ágar, para outras espécies de orquídeas armazenadas por 24h a 4°C , observaram 61% de germinação, aos 25 dias de cultivo, demonstrando que o teor de umidade das sementes e as condições de armazenamento, afetam diferentemente a fisiologia das espécies de orquídeas.

Embora tenham ocorrido perdas de viabilidade com o avanço do tempo de armazenamento, a porcentagem de germinação de *B. tuberculata* armazenada por 90 dias, foi superior a 70% em meios com concentrações mais elevadas de $4\text{ a }8\text{ g L}^{-1}$ de ágar, indicando que o processo de envelhecimento não foi acentuado neste tempo de armazenamento, pois em períodos mais prolongados de armazenamento as reservas de lipídios presentes nas sementes podem estar sujeitas ao processo de peroxidação, um

dos eventos mais deletérios, pois causa danos às membranas celulares e outras macromoléculas (MACHADO-NETO e CUSTÓDIO, 2005).

Concentrações de ágar variando de 0 a 3 g L⁻¹ proporcionaram efeitos lineares decrescentes na %G à medida que o tempo de armazenamento aumentou. Valores médios em torno de 95,5% foram registrados em TA(0) e de 79,5% para TA(90) nessas concentrações (Figura 2A, 2B, 2C, 2D).

A utilização de concentrações de ágar variando de 4 a 8 g L⁻¹ propiciou efeito quadrático na %G de *B. tuberculata*. As maiores porcentagens de germinação (média de 93,5%) foram calculadas para o período médio de armazenamento de 11,5 dias. Para essas concentrações de ágar o armazenamento por 90 dias propiciou %G média de 74,4% (Figura 2E, 2F, 2G, 2H, 2I), 5% a menos do que aquelas armazenadas pelo mesmo período, porém cultivadas em concentrações de ágar variando de 0 a 3 g L⁻¹ (Figura 2A, 2B, 2C, 2D).

Possivelmente, o aumento da concentração de ágar promoveu a redução do potencial osmótico do meio MS ½, dificultando a embebição de água pelas sementes, consequentemente, interferindo na germinação de sementes armazenadas por maior período de tempo.

Segundo Pasqual et al., (2009), concentrações de ágar entre 6 e 8 g L⁻¹ prejudicam o crescimento de *Cattleya loddigesii*, por limitar a absorção de sais minerais e por dificultar o contato do explante com o meio.

O emprego de meios mais consistentes para germinação de orquídeas tem sido empregado com bastante frequência. Dowling e Jusaitis (2012), estudando a germinação de quatro espécies de orquídeas, em meio MS (½ sais inorgânicos) (MURASHIGE E SKOOG, 1962), com 8 g L⁻¹ de ágar, aos 70 dias de cultivo, observaram que cápsulas mantidas em condições ambientais de armazenamento, duas espécies apresentaram germinação entre 80 e 95%, próximas ao observado neste trabalho, enquanto as outras apresentaram entre 50 e 60%, indicando que as diferenças observadas nas respostas foram devidas ao efeito do genótipo.

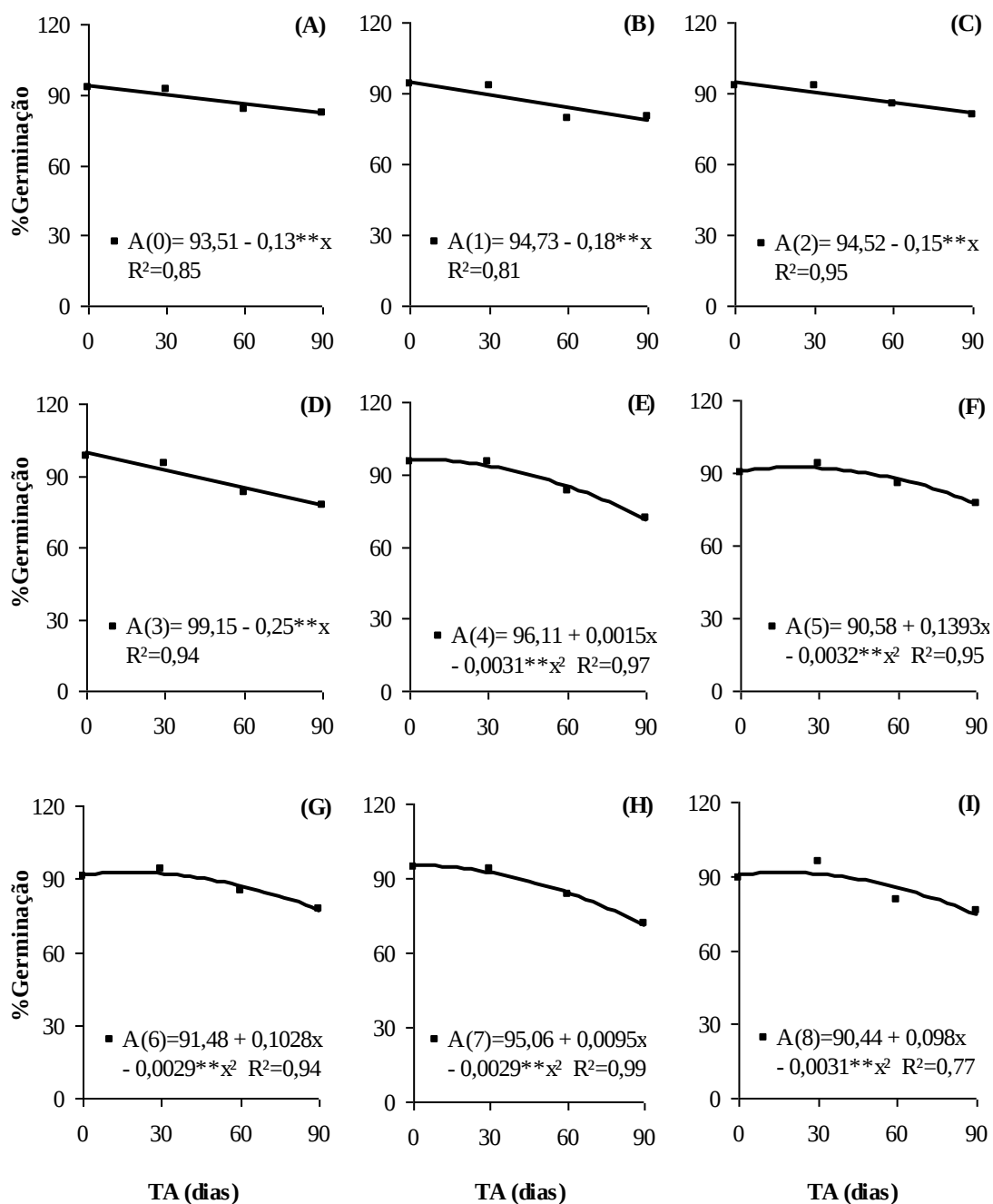


FIGURA 2. Porcentagem de germinação de *Brassavola tuberculata* Hook., nas concentrações de ágar: (A) 0 g L⁻¹; (B) 1 g L⁻¹; (C) 2 g L⁻¹; (D) 3 g L⁻¹; (E) 4 g L⁻¹; (F) 5 g L⁻¹; (G) 6 g L⁻¹; (H) 7 g L⁻¹; (I) 8 g L⁻¹, em função do tempo de armazenamento (TA). Dourados, UFGD, 2013.

Dutra et al. (2008), avaliando a germinação de sementes de *Bletia purpurea*, armazenadas em ambiente natural e refrigeradas a -10°C, em diferentes meios (inclusive MS½), solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar e dois fotoperíodos (16/8 e 0/24 horas de L/E), observaram germinações de 96,3% a 100%, independente dos meios e fotoperíodos estudados, próximos a porcentagem de germinação de *B. tuberculata*. No entanto, para

Cyrtopodium punctatum, nas mesmas condições anteriores, a porcentagem de germinações foi de 12,8% na presença de luz e 80% na ausência (DUTRA et al., 2009).

Espécies distintas de *Cymbidium* germinadas em meio MS, com 8 g L⁻¹ de ágar, após 45 dias da semeadura apresentaram respostas diferentes para germinação, enquanto *Cymbidium aloifolium* apresentou 90% de germinação (DEB e PONGENER, 2011), próxima à *B. tuberculata* em ausência de armazenamento e aos 30 dias após a semeadura, *Cymbidium bicolor* Lindl., apresentou 55,6% de germinação (MAHENDRAN et al., 2013).

Na germinação assimiótica de sementes de orquídeas, em meio MS solidificado com 6 a 9 g L⁻¹ ágar, após 15 a 56 dias de cultivo, a porcentagem de germinação variou de 45 a 68,8%, (HOSSAIN, 2008; PATHAK et al., 2011; ROY et al., 2011), sendo portanto inferiores às observadas neste trabalho.

Os resultados deste trabalho indicam que as sementes de *B. tuberculata* armazenadas por até 90 dias, não encontraram dificuldade para germinar no meio avaliado mesmo em 8 g L⁻¹ ágar. No entanto, o aumento das concentrações de ágar ocasionou redução na porcentagem de germinação, quando armazenadas por períodos superiores a 30 dias. Portanto, os resultados demonstram que as perdas de viabilidade aumentaram à medida que aumentaram o período de armazenamento, nas concentrações mais elevadas de ágar. Para as avaliações realizadas aos 90 dias, as perdas não foram significativas, não prejudicando, portanto o potencial germinativo e a manutenção da espécie.

4. CONCLUSÕES

O emprego dos meios líquido e sólido favorecem a germinação de *B. tuberculata*, já que germinam sem aeração em meio líquido, o meio líquido é mais adequado.

Sementes de *B. tuberculata* armazenadas por 90 dias apresentam germinação acima de 70%, mantendo, portanto a variabilidade da espécie.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, B.; LISTYORINI, F. H.; AMRIATI, B. *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae).

International Research Journal of Plant Science, New Jersey, v. 2, n. 5, p. 154-159, 2011.

ABRAHAM, S.; AUGUSTINE, J.; THOMAS, T. D. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 18, n. 3, p. 245–251, 2012.

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol. 28, n. 2, p. 92-98, 2006.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley, 1992. 691 p.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 21 out. 2013.

BELLONE, R. **Orquídeas: Guía del aficionado**. Ediciones Omega. Barcelona. 2006. 544 p.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, p. 213-228, 2008.

BHOYROO, V.; PUCHOOA, D.; SANMUKHIYA, V. M. An assessment of plant growth regulators on asymbiotic development and germination of immature embryos of *Beclardia macrostachya* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 2, n. 1, p. 30-33, 2011.

DEB, C. R.; PONGENER, A. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 20, n. 1, p. 90-95, 2011.

DOWLING, N.; JUSAITIS, M. Asymbiotic *in vitro* germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 60, p. 592-601, 2012.

DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; KAUTH, P. J.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 1, p. 11-21, 2008.

DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 235-243, 2009.

FARIA, R. T. de; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. da. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – a computer statistical analysis system.** Versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA. 2011.

FERREIRA, D. L. **Banco de sementes e sistemas de propagação *in vitro* como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.** 2012. 91p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K.; ISHIKAWA, K.; ISHIKAWA, M.; MII, M. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, Dordrecht, v. 3, p. 103-109, 2009.

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

HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 20, p. 3614-3619, 2008.

HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; SILVA, J. A. T. da; PATHAK, P. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 479-487, 2010.

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

KUSUMOTO, M. Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Quioto, 48, n. 4, p. 503-509, 1980.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, Sarasota, v. 25, n. 2, p. 229-235, 2005.

MAHENDRAN, G.; MUNIAPPAN, V.; ASHWINI, M.; MUTHUKUMAR, T.; NARMATHA BAI, V. Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. **Acta Physiol Plant**, Kraków, v. 35, p. 829-840, 2013.

MARTINS, L.; LAGO, A. A. do. Conservação de sementes de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol. 30, n. 1, p. 161-167, 2008.

MOHANTY, P.; PAUL, S.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. **AoB PLANTS**, Oxford, v. 2012, p. 1-8, 2012.

MUÑOZ, M.; JIMÉNEZ, V. M. Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. **Lankesteriana**, Cartago, v. 8, n. 2, p. 23-31, 2008.

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

MWEETWA, A. M.; WELBAUM, G. E.; TAY, D. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 257-262, 2008.

PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M. A. de; REZENDE, J. C. de; ARAÚJO, A. G. de; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 211-216, 2009.

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

PATHAK, P.; PIRI, H.; VIJ, S. P.; MAHANT, K. C.; CHAUHAN, S. *In vitro* propagation and mass scale multiplication of a critically endangered epiphytic orchid, *Gastrochilus calceolaris* (Buch.-Ham ex J. E. Sm.) D. Don. using immature seeds. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 49, p. 711-716, 2011.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. de A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizantes mineral. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, 2012.

ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 325–331, 2011.

SCHWALLIER, R.; BHOOPALAN, V.; BLACKMAN, S. The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 136-140, 2011.

SEATON, P. T.; HAILES, N. S. J. Effect of temperature and moisture content on viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: Pritchard HW. (Ed). Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge: University Press, 1989. p. 17-29.

SHADANG, R.; DWIVEDI, P.; HEGDE, S. N.; AHMED, N. Effects of different culture media on seed germination and subsequent *in vitro* development of protocorms

of *Hygrochilus parishii* (Veith & Rchb.f.) Pfitz (Orchidaceae). **Indian Journal of Biotechnology**, Nagaland, v. 6, p. 256-261, 2007.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling developmente of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 2, p. 147-158, 2006.

STOUTAMIRE, W. P. **Seeds and seedlings of native orchids**. Michigan Botanist 3: 107-119. 1964.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Choron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 04, p. 657-666, 2009.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.

THAKUR, U.; DONGARWAR, N. Artificial pollination and *in vitro* asymbiotic seed germination in garden orchid *Spathoglottis plicata* Blume (Orchidaceae). **Recent Research in Science and Technology**, Humnabad, v. 4, n. 2, p. 13-18, 2012.

ZENG, S.; WU, K.; SILVA, J. A. T. da; ZHANG, J.; CHEN, Z.; XIA, N.; DUAN, J. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 198-209, 2012.

CAPÍTULO IV: CRESCIMENTO DE *Brassavola tuberculata* Hook. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEIO MURASHIGE & SKOOG

RESUMO

O meio de cultura precisa fornecer todas as substâncias essenciais ao crescimento das plantas *in vitro*, variando conforme as exigências de cada espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio MS, no crescimento inicial de plantas de *Brassavola tuberculata* Hook. Plantas com 180 dias após a semeadura *in vitro*, foram transplantadas em meio de cultura MS, com concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 ou 200%, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Após a transferência das plantas, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob 25±2°C e fotoperíodo de 12h. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e três repetições. Aos 150 dias do transplante, foram feitas avaliações da porcentagem de sobrevivência, número de perfilhos e de raízes, comprimento da maior folha e da maior raiz e massa fresca da planta. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão. As plantas de *B. tuberculata*, apresentam maior crescimento inicial quando cultivadas em meio MS com concentração entre 70 e 75%. A utilização do meio MS 50% é promissor quando o objetivo for a multiplicação *in vitro* de *B. tuberculata*.

Palavras chave: meio de cultura, cultivo *in vitro*, orquídea nativa, propagação.

GROWTH *Brassavola tuberculata* Hook. IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MURASHIGE & SKOOG MEDIUM

ABSTRAT

The culture medium must provide all substances essential to plant growth *in vitro*, varying according to the requirements of each species. This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of MS medium, at the initial growth *Brassavola tuberculata* Hook. Plants with 180 days after *in vitro* culture, were transplanted in MS medium with concentrations of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 or 200%, supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 6,0 g L⁻¹ bacteriological agar. After the transfer of plants, the flasks were kept in a growth room at 25±2°C and photoperiod of 12h. The experimental design was completely randomized, with 15 treatments and three replications. At 150 days after transplantation, were evaluated for survival percentage, number of tillers and roots, length of longest root and leaf and fresh plant. The data were submitted to analysis of variance and regression later. The plants *B. tuberculata* Hook, have higher initial growth when cultured on MS medium with concentration ranging between 70 and 75 %. Use of MS 50% medium is promising when the objective is the *in vitro* multiplications of *B. tuberculata*.

Key words: medium culture, *in vitro* cultivation, native orchid, propagation.

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 35.000 espécies, 120.000 híbridos naturais e artificiais, distribuídos em 800 gêneros (FARIA et al., 2010). No Brasil existem 2.449 espécies distribuídas em 240 gêneros (BARROS et al., 2013).

Devido a sua importância ornamental, as orquídeas são coletadas indiscriminadamente da natureza. Associado a isso, a destruição de grandes áreas de seu habitat, levou muitas espécies a serem catalogadas como ameaçadas de extinção, havendo necessidade de sua propagação em larga escala com objetivo de comercialização e reintrodução (ABBAS et al., 2011; ABRAHAM et al., 2012).

Algumas espécies do gênero *Brassavola*, nativas do Brasil (PAULA & SILVA, 2006), são muito utilizadas na produção de híbridos intergenéricos duplos e triplos (SOARES et al., 2012), resultando em plantas com flores de extraordinária beleza, comercializadas a elevados valores no mercado interno e externo.

Brassavola tuberculata Hook. é uma orquídea epífita nativa, distribuída desde o Rio de Janeiro até o sul do país, incluindo Uruguai, Paraguai e Bolívia (BELLONE, 2006), além do cerrado brasileiro (MENDONÇA et al., 1998), inclusive Mato Grosso do Sul (RECH et al., 2011).

Técnicas de cultivo *in vitro* têm sido amplamente utilizadas na propagação de orquídeas (SUZUKI et al., 2010), possibilitando a produção em massa de plantas de excelente qualidade, a preços acessíveis, preservando as espécies, e evitando sua extinção (SUZUKI et al., 2009).

O meio de cultura utilizado é um dos fatores que influencia o sucesso do cultivo *in vitro*. Este meio precisa fornecer todas as substâncias essenciais para as culturas, variando conforme as exigências de cada espécie nas diferentes etapas de seu crescimento (PASQUAL, 2001; CALDAS et al., 1998; ARAÚJO et al., 2009; BESSON et al., 2010).

Um dos meios de cultura mais utilizados para propagação *in vitro* de Orchidaceae é o MS (GEORGE e KLERK, 2008; FERREIRA et al., 2010; COLOMBO et al., 2012). A formulação desenvolvida por Murashige e Skoog (1962) é rica em macro e micronutrientes, vitaminas e sacarose, o que favorece o desenvolvimento de plantas. Porém, sua elevada concentração de nutrientes, algumas vezes mostra-se

inadequada ao cultivo de determinadas espécies, necessitando de modificações (REGO-OLIVEIRA, 2005; STANCATO et al., 2008; LI e XU et al., 2009).

Segundo Hoffmann et al. (1997), a redução das concentrações de sais nos meios de cultura, promove o melhor crescimento de tecidos em orquídeas. Assim a determinação da concentração ideal do meio MS, para cada espécie, potencializa o seu crescimento (PASQUAL et al., 1997).

Em vista do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de diferentes concentrações do meio MS, no crescimento inicial de plantas de *Brassavola tuberculata* Hook.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), de outubro de 2012 a março de 2013.

Para tanto, foram utilizadas plantas de *B. tuberculata*, com 1,5cm de altura, providas de raízes, oriundas de semeadura *in vitro* e cultivadas, por 180 dias, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), em sala de crescimento com temperatura média 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

No experimento utilizou-se o meio de cultura MS, nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 ou 200%, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico e o pH $5,8 \pm 0,1$ (ajustado com KOH - 1M). Foram utilizados como frascos de cultivo, recipientes de vidro transparentes com capacidade para 600 mL, providos de tampa metálica, que após receberem 60 mL de um dos 15 meios nutritivos estudados, foram esterilizados em autoclave a 120°C e à pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$ por 20 minutos.

Após o resfriamento dos meios de cultura, os frascos foram transferidos para ambiente asséptico, e cada um deles recebeu quatro plantas. Na sequência, os frascos foram tampados e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, com temperatura média 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de $20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Decorridos 150 dias do transplante, os frascos foram abertos, as plantas foram removidas dos meios de cultura e avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência, número de perfilhos e de raízes, comprimento da maior folha e da maior raiz e massa fresca da planta (parte aérea e sistema radicular), sendo posteriormente calculados os percentuais de massa fresca da parte aérea e das raízes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e três repetições constituídas de um frasco de cultivo cada. Os dados percentuais foram transformados por meio da função $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, todas as variáveis foram submetidas à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). Havendo significância, as médias das variáveis foram submetidas à análise de regressão.

3 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância com a significância ou não das concentrações do meio MS sobre as variáveis analisadas bem como sua média geral são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Resumo das análises de variância da massa fresca de planta (MFP), porcentagem de massa fresca de parte aérea (%MFPA) e massa fresca de raiz (%MFR), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento maior folha (CMF), número de perfilho (NP) e porcentagem de sobrevivência (%SOB) de *Brassavola tuberculata* Hook.

F.V.	G.L.	Quadrados médios			
		MFP	%MFPA	%MFR	NR
Concentração	14	1,13**	14,94**	12,82**	1,17**
Resíduo	30	0,23	0,73	1,09	0,19
CV(%)		4,28	11,97	17,99	18,70
Média geral		0,31g	55,7%	37,6%	5,04

F.V.	G.L.	CMR	CMF	NP	%SOB
Concentração	14	10,31**	3,82**	0,86**	17,99**
Resíduo	30	0,49	0,43	0,11	1,53
CV(%)		18,08	16,43	13,97	13,97
Média geral		17,7mm	16,4mm	5,0	84,4%

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F

As concentrações de meio MS apresentaram efeito significativo ($p < 0,01$),

para todas as variáveis relacionadas ao crescimento de plantas de *Brassavola tuberculata* (Quadro 1).

Concentrações do meio MS até 50% propiciaram porcentagem de sobrevivência de 100%. A partir dessa concentração os valores decresceram, sendo calculadas porcentagens de sobrevivência de 90 e 9%, para as concentrações de 100 e 200% do meio MS, respectivamente (Figura 1A).

Para a parte aérea, concentrações do meio de 55 a 85% apresentaram os melhores resultados sobre as características vegetativas. O maior número de perfilhos (6,0) foi obtido na concentração do meio MS de 55% (Figura 1B), o que contribui para a formação de maior número de hastes florais e consequentemente maior número de flores, atributos de grande interesse para a espécie.

A maioria dos trabalhos atribui o maior perfilhamento de Orchidaceae à adição de citocinina combinada ou não com auxina em meio de cultivo MS (PANT e PRADHAN, 2010; PANT e SWAR, 2011; ARENMONGLA e DEB, 2012; ASGHAR et al., 2012), entretanto para *B. tuberculata* a utilização do meio MS 50% propiciou perfilhamento sem a utilização de fitorreguladores.

O maior comprimento de folha (23,5mm) foi obtido com concentração do meio MS de 85% (Figura 1D). Alguns relatos científicos mostram variação no comprimento da folha em função da espécie estudada. Dezan et al. (2012), verificaram maior comprimento de folhas de *Schomburgkia gloriosa* em meio MS ½. Li e Xu et al. (2009), registraram alongamento de folhas de *Rhynchostylis gigantean* cultivada em meio MS, assim como Suzuki et al. (2009), relataram que o meio MS foi mais eficaz na produção de folhas de *Hadrolaelia tenebrosa* e mesmo resultado foi observado para a espécie *Cattleya bicolor* Lindley (SUZUKI et al., 2010). Já Vasudevan e Van Staden (2010), não observaram diferenças estatísticas no maior número e comprimento foliar de *Ansellia africana* Lindl, com a utilização de meio MS ou MS ½.

O sistema radicular das plantas apresentou maior desenvolvimento na ausência do meio MS. O maior número de raízes (8,0), assim como o comprimento da maior raiz (43,0 mm) foram registrados nessa condição (Figura 1C e 1E). As orquídeas epífitas apresentam raízes com velames, estrutura que absorve e armazena água e nutrientes (DRESSLER, 1993), e em função de seu desenvolvimento lento, a disponibilização de nutrientes para a planta no habitat é lenta e gradual (ARDITTI, 1992), evidenciando que o fornecimento de nutrientes no meio de cultura deve ser em baixas concentrações, onde ocorreram os melhores resultados.

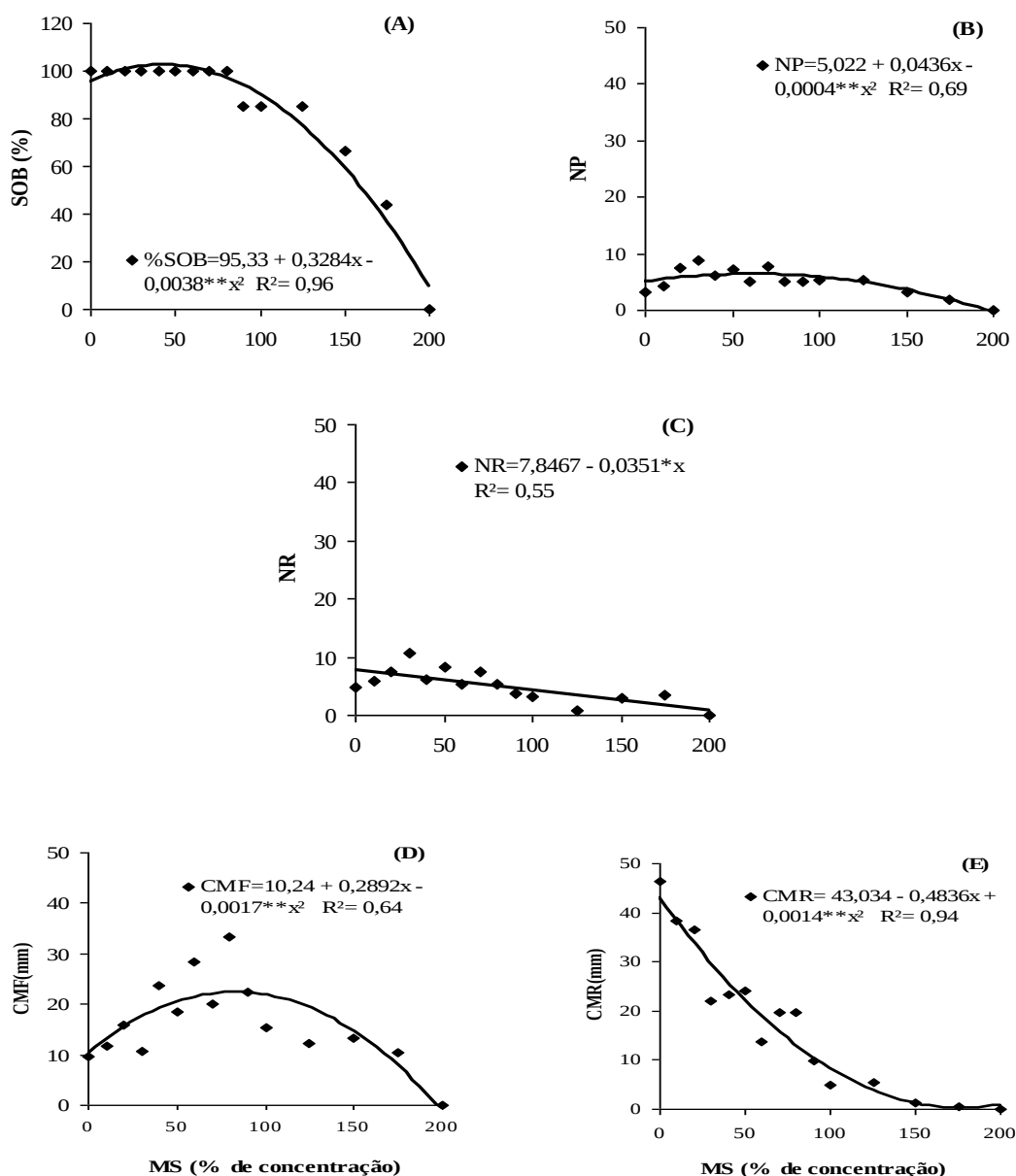


FIGURA 1. Características vegetais de *Brassavola tuberculata* Hook. em função das concentrações do meio MS. (A) porcentagem de sobrevivência (%SOB); (B) número de perfilhos (NP); (C) número de raízes (NR); (D) comprimento da maior folha (CMF); (E) comprimento da maior raiz. Dourados, UFGD, 2013.

Os resultados desse trabalho se contrapõem aos relatos de Rego-Oliveira e Faria (2005), que obtiveram maior número e comprimento da maior raiz de *Catasetum fimbriatum* em meio MS com 50% de macronutriente e em MS com 25% de macronutrientes para *Cyrtopodium paranaenses*. Besson et al. (2010), também obtiveram maior número de raízes de *Miltonia flavesceus* em meio MS 50%. De

maneira semelhante, Colombo et al. (2012), obtiveram o maior número e comprimento de raízes de um híbrido de *Phalaenopsis* (*P. amabilis* x *P. equestris*) em meio MS com 50% da concentração de macronutrientes, assim como Kong et al. (2007), estudando o enraizamento de brotos de *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f., observaram maior número e comprimento de raízes no meio MS 50%.

O maior número e comprimento de raiz de *B. tuberculata* observados nas concentrações reduzidas do meio MS podem ser explicados, pelo fato de que, dependendo da espécie cultivada, a redução da concentração iônica dos meios de cultura favorece o desenvolvimento de raízes (PASQUAL, 2001), portanto, a formação *in vitro* de um sistema radicular funcional e bem desenvolvido é um dos pontos fundamentais para a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (BESSON et al., 2010).

Em relação à massa fresca das plantas, concentração de 53% propiciou a maior massa fresca (0,38g) da planta (Figura 2A), enquanto a porcentagem relativa à parte aérea das plantas (81,1%) foi maior em concentração de 105% (Figura 2B) e a do sistema radicular (76,3%) ocorreu na ausência de nutrientes (Figura 2C).

Segundo Rodrigues et al. (2012), a relação ideal de parte aérea/raiz em plantas *in vitro* é em torno de 2,0. Neste trabalho relação de 2,1 foi observada na concentração de 70% do meio MS. Embora as plantas produzidas durante o período experimental ainda não possuíssem tamanho adequado à aclimatização *ex vitro*, necessitando de subcultivos, a concentração de 70% de sais do meio MS propiciou um balanço adequado de fotoassimilados na planta.

Como neste trabalho não foram observadas diferenças estatísticas em relação à massa fresca da planta em concentrações entre 40 e 70 %, pode-se inferir que, se forem subcultivadas em meio MS com 70% da concentração, poderão atingir um crescimento de parte aérea que suporte as condições *ex vitro* de luminosidade e um sistema radicular com desenvolvimento adequado à absorção de água e nutrientes, possibilitando sua fixação no substrato e evitando danos físicos durante o processo de aclimatização.

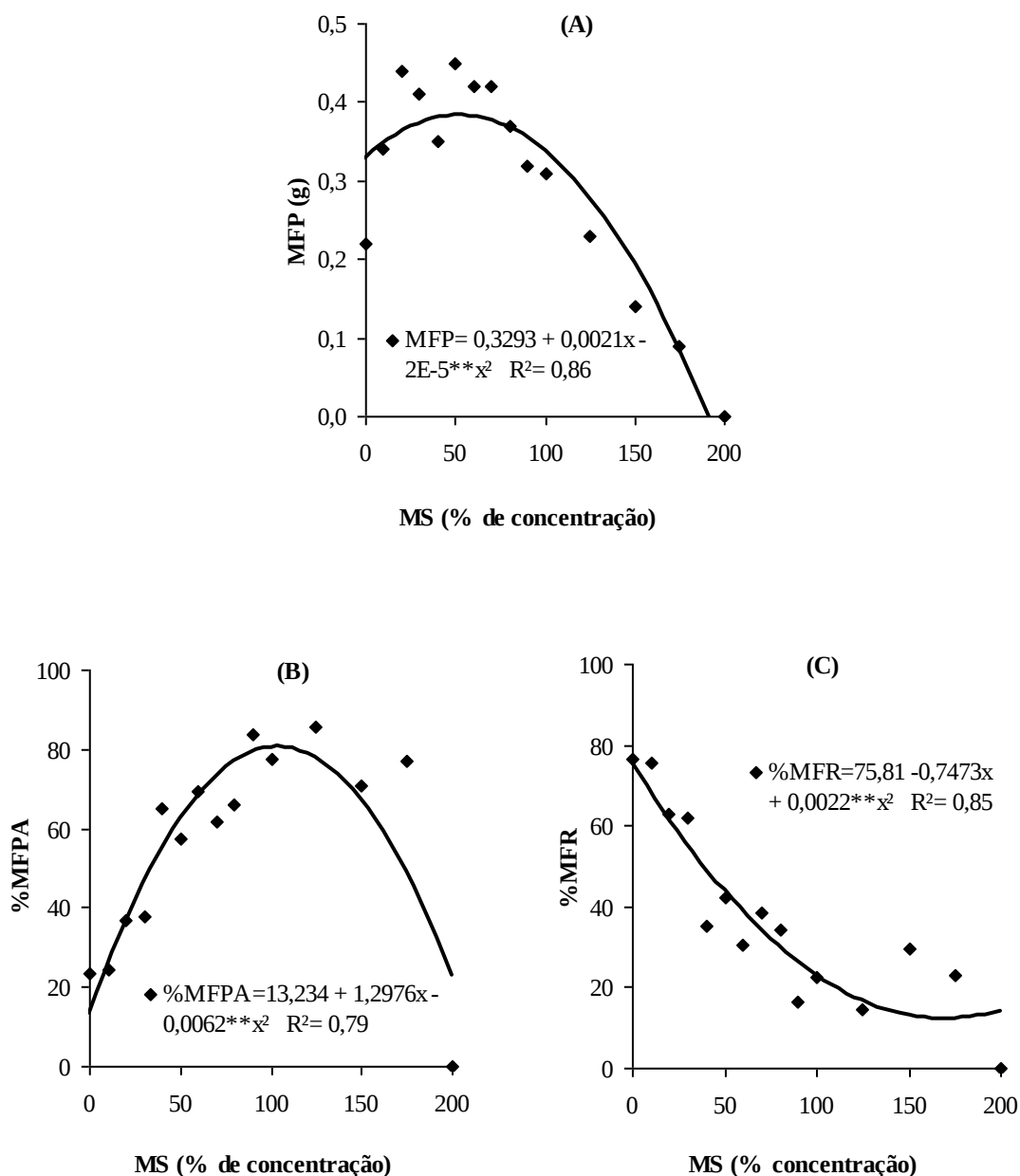


FIGURA 2. Massa fresca de *Brassavola tuberculata* Hook. em função das concentrações de meio MS. (A) massa fresca da planta; (B) porcentagem de massa fresca da parte aérea; (C) porcentagem de massa fresca das raízes. Dourados, UFGD, 2013.

4. CONCLUSÃO

Plantas de *Brassavola tuberculata* Hook, apresentam maior crescimento inicial quando cultivadas em meio MS com concentração variando entre 70 e 75%. A

utilização do meio MS 50% é promissor quanto o objetivo for à multiplicação *in vitro* de *B. tuberculata*.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, B.; LISTYORINI, F. H.; AMRIATI, B. *In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). **International Research Journal of Plant Science**, New Jersey, v. 2, n. 5, p. 154-159, 2011.

ABRAHAM, S.; AUGUSTINE, J.; THOMAS, T. D. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 18, n. 3, p. 245–251, 2012.

ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley, 1992. 691 p.

ARENMONGLA, T.; DEB, C. R. Germination of immature embryos and multiplication of *Malaxis acuminata* D. Don, an endangered therapeutically important orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. **Indian Journal of Biotechnology**, Nagaland, v. 11, n. 4, p. 464-469, 2012.

ASGHAR, S.; AHMAD, T; HAFIZ, I. A; YASEEN, M. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 16, p. 3097-3103, 2011.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 21 out. 2013.

BELLONE, R. **Orquídeas: Guía del aficionado**. Barcelona:Ediciones Omega. 2006. 544 p.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltônia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto de Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.

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

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T. de. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.6, p. 873-876, 2012.

DEZAN, L. F.; CANASSA, F.; SOUZA-LEAL, T. de; DIOGO, J. A.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; MORAES, C. P. de. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificado. **Idesia**, Arica, v. 30, n. 2, p. 53-58, 2012.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge, 1993. 321 p.

FARIA, R. T. de, ASSIS, A. M. de; CARVALHO, J. F. R. P. de. **Cultivo de Orquídeas**. Londrina: Mecenias, 2010. 208 p.

FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; FARIA, R. T. de; RIBEIRO, J. P. N.; CASALI, C. A. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 636-639, 2010.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – a computer statistical analysis system**. Versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA. 2011.

GEORGE, E. F.; KLERK, G. J. D. The components of plant tissue culture media I: macro and micro nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. Dordrecht: Springer. 2008. p. 65-113

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos - Tecnologia e aplicações: aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 130 p.

KONG, Q.; YUAN, S. Y.; VÉGVÁRI, G. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 13, n. 1, p. 61-64, 2007.

LI, Z. Y.; XU, L. *In vitro* propagation of white-flower mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Through immature seed-derived protocorm-like bodies. **Journal of Horticulture and Forestry**, Timișoara, v. 1, n. 6, p. 96-97, 2009.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C. da; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In : SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p. 289-556.

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

PANT, B.; PRADHAN, S. Micropropagation of *Cymbidium elegans* Lindl. through protocorm and shoot tip culture. In: ISLAM, A. S.; HAQUE, M. M.; SARKER, R. H.;

HOQUE, M. I. **Role of Biotechnology in food security and climate change.** Proceeding of 6^o International plant tissue culture and Biotechnology conference, 2010, Bangladesh Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology. Dhaka, Bangladesh. 2010. p.123-130.

PANT, B.; SWAR, S. Micropropagation of *Cymbidium iridioides*. **Nepal Journal of Science and Technology**, Kathmandu, v. 12, p. 91-96, 2011.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações** - Introdução: Fundamentos Básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

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

PAULA, C. C. de; SILVA, H. M. P. da. **Orchids: Botany and Growing.** 1. ed. Viçosa: Editora UFV. 2006. 106 p.

RECH, A. R.; ROSA, Y. B. C. J.; ROSA-JUNIOR, E. J. Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.3, Edição Especial, p.717-724, 2011.

REGO-OLIVEIRA, L. do V.; FARIA, R. T. de. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional cultura media and comercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; VILLANI, E. M. de A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizantes mineral. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, 2012.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SORGATO, J. C.; ROSA, D. B. C. J.; ROSA, C. B. C. J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 3, p. 226-233, 2012.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C.; Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 51-57, 2008.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. de M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 37, p. 731-742, 2010.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W. de M. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Choron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 04, p. 657-666, 2009.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 496-504, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo buscou-se o estabelecimento de protocolos eficientes e viáveis, mediante o ajuste de métodos de cultivo *in vitro*, para a germinação, desenvolvimento e crescimento inicial *in vitro* de *Brassavola tuberculata*. Os resultados observados nesse trabalho demonstraram que:

A polinização natural e a polinização cruzada manual em plantas de *Brassavola tuberculata* produzem sementes que germinam *in vitro*, enquanto na autopolinização manual as sementes não germinam. O fornecimento de citocinina exógena proporciona pouco efeito na germinação *in vitro* de *B. tuberculata*. As sementes provenientes de frutos colhidos aos 210 dias após a polinização e cultivados por período igual ou superior a 30 dias, promovem as melhores porcentagens de germinação.

Para sementes oriundas de polinização natural e de polinização cruzada manual, o maior número de protocormos foi observado em frutos coletados aos 180 DAP e a maior %P1 foi observada em frutos coletados aos 150 DAP. A maior %P4 foi observada em frutos coletados aos 150 DAP oriundos de polinização natural e aos 210 DAP oriundos de polinização cruzada.

Os meios líquidos e sólidos favorecem a germinação de semente de *B. tuberculata*, sendo o meio líquido mais adequado. Sementes de *B. tuberculata* armazenadas por até 90 dias apresentam germinação acima de 70%, mantendo a variabilidade das espécies.

Plantas de *B. tuberculata*, apresentam maior crescimento inicial quando cultivadas em meio MS com concentração variando entre 70 e 75%. A utilização do meio MS 50% é promissor quanto o objetivo for à multiplicação *in vitro* de *B. tuberculata*.