

**CÁSSIA MARQUES VIANA**

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Cattleya*  
*elongata* BARB. RODR. (ORCHIDACEAE JUSS.)**

SALVADOR

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL**  
**PROGR. DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIODIVERSIDADE**

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Cattleya elongata* BARB. RODR. (ORCHIDACEAE JUSS.)**

**CÁSSIA MARQUES VIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Mestre em Genética e Biodiversidade*.

**ORIENTADOR: DRA. MOEMA CORTIZO BELLINTANI (UFBA)**

**SALVADOR**

**2013**

Sistemas de Bibliotecas - UFBA

Viana, Cássia Marques.

Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata* BARB.  
*RODR. (Orchidaceae Juss.)* /

Cássia Marques Viana . - 2014.

82 f. : il.

Inclui apêndices.

Orientadora : Dr<sup>a</sup> Moema Cortizo Bellintani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Biologia, Salvador, 2013.

1. Orquídea. 2. Orquídea - Cultivo. I. Bellintani, Moema Cortizo. II.  
Universidade Federal da  
Bahia. Instituto de Biologia. III. Título.

CDD - 584.4

CDU - 582.594.1

---

Prof(a). Dr(a). Alone Lima Brito

---

Prof(a). Dr(a). Sheila Vitoria Resende

---

Prof(a). Dr(a). Moema Cortizo Bellintani  
Orientador e Presidente da Banca

Salvador  
2013

*A minha mãe, minha amiga, minha fortaleza.  
A qual sempre está ao meu lado, me ensinando, me guiando e comemorando a  
cada nova conquista e sonho realizado. Essa vitória também é sua.*

"Quem disse que acabou?  
Depois da meia noite, tudo será  
novo, de novo. Seja feliz."

Padre Fábio de Melo

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida.

A minha mãe, por enxergar o melhor em mim e para mim. Obrigada pelo constante incentivo e amor incondicional.

A toda a minha família, por sempre está me rodeando de carinho e torcendo para que eu consiga realizar os meus sonhos. Obrigada especial a tia Branca, tia Jane, tia Sully e tia Bia por todo ensinamento prestados desde a Educação Infantil. Bem como a tia Silvia e ao tio Bernardo pelos maravilhosos conselhos e eterna disponibilidade em me ajudar. Ju e Rico, obrigada por estarem diariamente em minha vida. Obrigada pelas risadas e perturbações, isso me faz ser mais feliz.

A Bianca Topázio, Brisa Cruz, Danilo Meireles, Lucas Anjos e Rafael Santiago, irmãos que tive a sorte de ganhar. Obrigada por me incentivarem, acariciarem, defenderem, telefonarem, divertirem, perdoarem e compartilharem todos os momentos da minha vida. Vocês foram alguns dos grandes responsáveis pela conclusão deste trabalho. Brisa e Lucas, obrigada também pelas nossas conversas e pela ajuda prestada durante esses últimos meses de escrita.

A Thiago Torres, uma pessoa mais que especial que entrou em minha vida em um dos momentos mais corridos e foi capaz de vivenciar junto comigo esta etapa final. Obrigada por compreender meus momentos de ausência, pela preocupação com o meu trabalho e por todo respeito, afeto, carinho.

A equipe de professores e estudantes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, aos presentes e aos que já passaram por lá e seguiram outros caminhos. Um agradecimento especial a Daniel Souza, Hédina Bezerra, Lucas Anjos, Raquel Souza e Tiago Silva por compartilharem comigo o amor pelas orquídeas. Maria Nazaré Marchi e Laila Civatti, obrigada pela disponibilidade e ajuda prestada. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Vitoria Resende, meu agradecimento pela

ajuda constante, pelos ensinamentos e pelo zelo. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Moema Cortizo Bellintani, obrigada por toda orientação prestada desde a Iniciação Científica e as oportunidades concedidas. Você foi essencial na minha formação profissional.

A equipe de professores e estudantes do Laboratório de Genética e Evolução de Plantas, pelas contribuições nestes últimos meses de pesquisa. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Selbach Schnadelbach, obrigada pela orientação, disponibilidade e confiança. A Lana Karine, obrigada pela ajuda e alegria nos momentos de desespero. A amiga Leila Conceição, muito, muito obrigada por dividir comigo os acasos da Biologia Molecular. Obrigada pelas fotos tiradas, pelos truques ensinados, pelos equipamentos reservados e pelas longas conversas. E, que a partir de agora, as fases da lua estejam sempre ao nosso lado (rs, rs).

A todos os colegas, amigos, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, pela convivência e colaboração. Um agradecimento especial ao amigo Daniel Carvalho por sempre está se preocupando com a realização do meu trabalho e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata L. Ferreira de Lima pelos ensinamentos prestados, pela infraestrutura cedida e pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Raymundo José de Sá Neto pela ajuda na análise estatística.

A FAPESB, pelo apoio ao Projeto PRONEM T.O. 0020/2011.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.



# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DA LITERATURA .....	6
OBJETIVOS.....	29
Capítulo 1 . Estabelecimento <i>in vitro</i> , caracterização genética de indivíduos e aclimatização de <i>Cattleya elongata</i> Barb. Rodr. (Orchidaceae).....	30
Capítulo 2 . Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cattleya elongata</i> Barb. Rodr. (Orchidaceae Juss.), visando o emprego de metodologias de baixo custo.....	57
CONCLUSÕES GERAIS .....	77
APÊNDICE .....	79

## RESUMO

*Cattleya elongata* é uma orquídea endêmica da Chapada Diamantina – BA e apresenta elevado potencial ornamental. No entanto, muitas populações estão reduzindo de tamanho, em decorrência da degradação de habitats e da coleta predatória. Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos vegetais são uma importante ferramenta, pois permitem conservar o germoplasma da espécie, bem como abastecer o mercado ornamental de forma sustentável. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estabelecimento e a multiplicação *in vitro*, a aclimatização e a conservação *in vitro* do germoplasma de *C. elongata*. Na germinação *in vitro* foi testada a influência da desinfestação do material vegetal, dos componentes do meio nutritivo e do carvão ativado na germinabilidade. No crescimento *in vitro* foi avaliada a influência da composição do meio nutritivo e do carvão ativado na sobrevivência e no desenvolvimento da plântula. Na multiplicação *in vitro* foi testada a influência de diferentes tipos de explantes e concentrações de reguladores vegetais ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina, bem como a influência do meio nutritivo em estado líquido sob diferentes regimes de agitação e suporte. Na aclimatização foi avaliada a influência de diferentes substratos no cultivo *ex vitro*. Para avaliação da representatividade do banco ativo de germoplasma (BAG) *in vitro* foram selecionadas 86 plantas, sendo a variabilidade genética analisada através de marcador ISSR (*Inter simple sequence repeats*). Para estabelecer plantas de *C. elongata in vitro*, deve-se realizar a desinfestação da cápsula e inocular as sementes diretamente em meio Murashige & Skoog (1962) (MS) a 3% de sacarose ou em meio simplificado. Para promover o crescimento da parte aérea sugere-se a utilização de meio MS com metade das concentrações salinas a 1,5% de sacarose ou de meio simplificado, ambos suplementados com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Para induzir o enraizamento, as plântulas devem ser cultivadas em meio simplificado suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Plântula *in vitro* com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, seccionada na porção superior, é o explante indicado para multiplicação de *C. elongata*. Quando utilizado este tipo de explante não é necessário suplementar o meio nutritivo com regulador

vegetal para induzir a brotação. Em contrapartida, melhor crescimento da parte aérea e do sistema radicular foi observado em culturas mantidas em meio suplementado com alta concentração de ANA (10,740  $\mu$ M). É dispensável o uso de BAP. É possível realizar a multiplicação em meio nutritivo em estado líquido. A aclimatização deve ser realizada em substrato composto por casca de *Pinus* e fibra de coco (1:1). O BAG *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia é eficiente para conservar o germoplasma da espécie, visto que é representativo em comparação às populações naturais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Orquídea; cultura de tecidos vegetais; aclimatização; BAG *in vitro*; marcador ISSR.

## ABSTRACT

*Cattleya elongata* is an endemic orchid of Chapada Diamantina – BA and has a high ornamental potential. However, many populations are reducing in size, due to the degradation of its habitats and predatory collecting. In this context, the techniques of plant tissue culture are an important tool because they allow to conserve the germplasm, as well as to make the ornamental plants market sustainable. The objective of this study was to perform in vitro establishment and multiplication, acclimatization and germplasm conservation of *C. elongata*. For the in vitro germination were tested the influence of disinfestation of the plant material, the components of nutrient medium and activated charcoal. For in vitro growth were evaluated the influence of the composition of the nutrient medium and activated charcoal on the development and survival of seedlings. In multiplication has been tested the influence of different types of explants and concentrations of plant growth regulators (naphthaleneacetic acid and 6-benzilaminopurina), as well as the influence of liquid nutrient medium under different schemes of agitation and support. In acclimatization was evaluated the influence of different substrates on the ex vitro cultivation. To assess the representativeness of the in vitro germplasm bank (BAG), 86 plants were selected and the genetic variability was analyzed using ISSR (inter simple sequence repeats) markers. To establish in vitro plants of *C. elongata*, one should perform the disinfestation of the capsule and inoculate the seeds directly in the Murashige Skoog (1962) medium with 3% of sucrose or in simplified medium. To promote the development of the aerial part of the seedlings it is advisable to use the MS medium with half concentration of salts with 1,5% of sucrose or simplified medium, both supplemented with 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. To induce the rooting, the seedlings must be grown in simplified medium supplemented with 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. Seedling in vitro with 0,3 cm long cut on the upper portion is the explant indicated for multiplication of *C. elongata*. When used this type of explant it is not necessary to use nutrient medium supplemented with growth regulator to induce sprouting. By contrast, the best development of aerial part and root system was observed in cultures maintained in medium supplemented with high concentrations of ANA (10.740 µM). The use of BAP is dispensable. It is possible to achieve the multiplication in liquid nutrient medium. Acclimatization should be realized in a

substrate composed by *Pinus* bark and coconut fiber (1:1). The in vitro BAG of the Laboratorio de Cultura de Tecidos Vegetais of Universidade Federal da Bahia is efficient to conserve germplasm because of its representativeness in relation to natural populations.

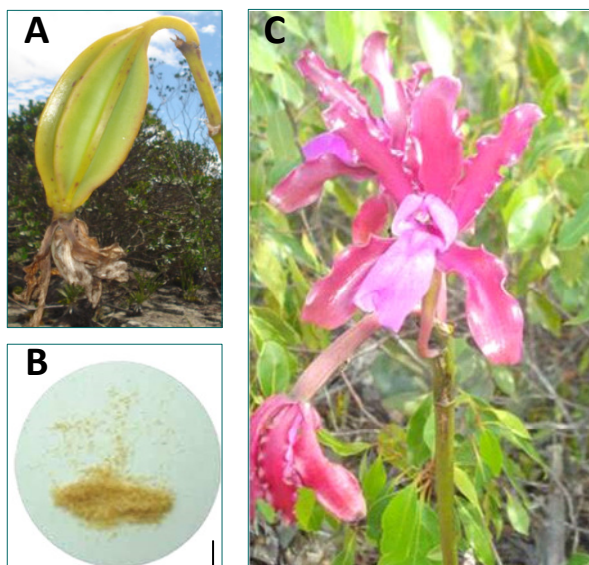
**KEYWORDS:** Orchid; culture of plant tissues; acclimatization; in vitro BAG; ISSR marker.

## INTRODUÇÃO

Os representantes da família Orchidaceae Juss. são encontrados em todas as regiões do planeta, com exceção dos polos e desertos extremamente secos (FARIA *et al.* 2004). No entanto, são nas regiões tropicais e subtropicais que uma maior diversidade é verificada (BARROS, 1990). Dentre as 24.500 espécies existentes (DRESSLER, 2005), o apêndice I do CITES (2013) cita *Aerangis ellisii*, *Dendrobium cruentum*, *Laelia jongheana*, *Laelia lobata*, *Paphiopedilum* spp, *Peristeria elata*, *Phragmipedium* spp. e *Renanthera imschootiana* como espécies em risco de extinção e, o apêndice II, inclui todo o restante da família. Neste caso, se o comércio não for rigorosamente controlado, as espécies listadas no apêndice II podem apresentar risco de extinção, como, por exemplo, a *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Figura 01).

*C. elongata* é uma espécie de ocorrência restrita a região da Chapada Diamantina e tem hábito exclusivamente rupícola (CRUZ *et al.*, 2003). Na natureza é facilmente reconhecida por apresentar pseudobulbos cilíndricos alongados e flores grandes vermelho-amarronzadas, de labelo magenta (TOSCANO-DE-BRITO & CRIBB, 2005; AZEVEDO & VAN DEN BERG, 2007), o que lhe atribui elevado potencial ornamental. Porém, o extrativismo e a degradação de habitats vêm reduzindo o tamanho de muitas populações naturais de *C. elongata* (CRUZ *et al.*, 2011). Neste contexto, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta porque permite conservar o germoplasma da espécie, bem como abastecer o mercado ornamental de forma sustentável.

Na propagação *in vitro*, o meio nutritivo fornece as substâncias necessárias ao desenvolvimento embrionário e ao crescimento da planta (STEFANELLO *et al.*, 2009; KANANONT *et al.*, 2010). Faria *et al.* (2012), citam as formulações Knudson C (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige & Skoog (1962) como as mais frequentemente utilizadas para o cultivo de orquídeas. Além de apresentarem os componentes essenciais, estes meios nutritivos tendem a ser suplementado com vitaminas, carboidrato, reguladores vegetais, carvão ativado, agentes gelificantes dentre outros compostos de modo a atender as necessidades metabólicas e fisiológicas de cada espécie (CALDAS *et al.*, 1998).



**Figura 01:** *Cattleya elongata*. A. Cápsula; B. Sementes; C. Flor. Barra: 1 cm

As orquídeas também podem ser cultivadas em meio nutritivo simplificado (FARIA *et al.*, 2012). No preparo deste tipo de meio podem ser utilizados água de coco, fertilizantes químicos, açúcar comercial, legumes e frutas (ARDITTI & ERNST, 1992; CALDAS *et al.*, 1998; CAMPOS, 2002; STANCATO *et al.*, 2008). Isso permite maior acessibilidade aos componentes do meio nutritivo, em especial para orquidófilos que realizam o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de forma caseira (FARIA *et al.*, 2012).

A consistência do meio nutritivo pode ser líquida ou semi-sólida. Neste último caso, o agente gelificante rotineiramente utilizado é o ágar ou o gelrite. No entanto, em decorrência do alto custo, já existem trabalhos que sugerem não utilizar esses gelificantes durante o preparo do meio nutritivo (JUNGHANS *et al.*, 2009).

O uso de meio nutritivo em estado líquido reduz os custos de produção, bem como promove maior agilidade durante o preparo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; FARIA *et al.*, 2012). Para algumas culturas *in vitro* é necessário algum tipo de suporte, de modo a auxiliar no processo de oxigenação do material vegetal. Outra alternativa para reduzir os custos de produção é o uso de agentes gelificantes alternativos, como já relatado por Fialho *et al.* (2011) e Aggarwal & Nirmala (2012) no cultivo de orquídeas.

As culturas mantidas *in vitro* podem ser utilizadas para fins de conservação, de reintrodução ou para atender a demanda do mercado ornamental. Nestes dois últimos casos é necessário transferir as plantas mantidas sob condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro*.

Quando o objetivo é realizar a conservação em bancos ativos de germoplasma (BAGs) *in vitro*, o material vegetal deve ser mantidas em meio nutritivo, sob condições controladas de temperatura e luminosidade. A análise da diversidade genética do BAG *in vitro*, bem como a sua representatividade em relação às populações naturais pode ser realizada com o auxílio das técnicas da biologia molecular.

O ISSR (*Inter simple sequence repeats*) é um marcador dominante que vem sendo comumente utilizado para estudos genéticos em plantas. O emprego desta técnica envolve a amplificação de segmento de DNA que se localizam entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas (REDDY *et al.*, 2002).

A utilização deste tipo de marcador demanda baixo custo, pouca infraestrutura e pequena quantidade de DNA; apresenta alta reprodutibilidade e polimorfismo, bem como rapidez na obtenção de informações a cerca da diversidade genética em comparação a outros tipos de marcadores. Sendo assim, à medida que houver necessidade em proteger o germoplasma de espécies ou híbridos, o marcador ISSR tem um importante papel porque apresenta boa eficiência em distinguir variabilidade entre indivíduos mesmo que estes sejam estreitamente relacionados (REDDY *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve por objetivo promover a conservação da espécie *C. elongata*, bem como estabelecer metodologias de multiplicação *in vitro* que permitam abastecer o mercado ornamental de forma sustentável.



## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; NIRMALA, C. 2012. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for *in vitro* orchid seed germination. **Scientia Horticulturae**, **133**: 89-92.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. 1992. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons Inc. 682 p.
- AZEVEDO, C.O.; VAN DEN BERG, C. 2007. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, **34 (1)**: 1-47.
- BARROS, F. 1990. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae Brasileiras. **Acta bot. bras.**, **4 (1)**: 177-187.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 87-132.
- CAMPOS, D.M. 2002. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 143 p.
- CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices I e II, 2013. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>. Acesso em: 04/10/2013.
- CRUZ, D.T.C.; BORBA, E.D.; VAN DEN BERG, C. 2003. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, **3 (1, 2)**: 26-34.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Syst. Evol.**, **294**: 87-98.
- DRESSLER, R.L. 2005. How many orchid species? **Selbyana**, **26 (1, 2)**: 155-158.
- FARIA, R.T.; VICENTE, A.P.R.M.; COSTA, T.M.M.; FONSECA, I.C.B.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A. 2004. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação *in vitro*. **Semina**, **25 (4)**: 309-314.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. 2012. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenas. 116p.

- FIALHO, G. S.; VALE, J. C.; SOBREIRA, F. M.; SCHMILDT, E. R. 2011. Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (*Orchidaceae*), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. **IDESIA**, **29 (1)**: 103-105.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 183-260.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, F.V.D. 2009. Redução de custos na micropropagação. *In*: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA. Pp.153-175.
- KANANONT, N.; PICHYANGKURA, R.; CHANPRAME, S.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. 2010. Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids. (Asparagales: Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, **124 (2)**: 239-247.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orquid Society Bulletin**, **14**: 214-217.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, **128**: 9-17.
- STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, **67 (1)**: 51-57.
- STEFANELLO, S.; KARSTEN, J; MÜLLER, T.S.; TOMCZAC, A.P.; BONETT, L.P.; SCHUELTER, A.R. 2009. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciênc. agrotec.**, **33 (1)**: 53-59.
- TOSCANO-DE-BRITO, A.; CRIBB, J.C. 2005. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. São Paulo: Nova Fronteira. 400 p.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. 1949. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, **110**: 605-617.

## REVISÃO DA LITERATURA

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas, com cerca de 24.500 espécies (DRESSLER, 2005), distribuídas por quase todas as regiões do planeta, com exceção dos polos e desertos extremamente secos (FARIA *et al.* 2004). No entanto, são nas regiões tropicais e subtropicais que uma maior diversidade é verificada (BARROS, 1990), sendo descrita para o Brasil a ocorrência de 2.419 espécies agrupadas em 235 gêneros (BARROS *et al.*, 2010). Destas, 1.620 espécies são endêmicas e 419 são registradas para o Estado da Bahia (BARROS *et al.*, 2010).

De hábito predominante herbáceo, podendo ser epífitas, hemiepífitas, rupícolas, terrícolas ou, menos comumente, micoheterotróficas (VIEIRA, 2013), as orquídeas apresentam fruto do tipo cápsula, o qual contém, aproximadamente, 2,5 milhões de sementes muito pequenas e leves (STANCATO & FARIA, 1996; FARIA *et al.*, 2012). Em decorrência do seu tamanho, as sementes são desprovidas de cotilédone e têm endosperma extremamente reduzido, não dispondo dos nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião (FERREIRA *et al.*, 2010). Então, para germinarem sob condições naturais, é necessário associação com fungos micorrízicos, os quais favorecem a absorção de algumas substâncias essenciais.

Na etapa inicial, há a formação de uma estrutura tuberiforme e geralmente clorofilada, o protocormo (KRAUS *et al.*, 2006). Em seu polo caulinar ocorre formação de sucessivas folhas, passando a receber a denominação de plântula, e, na extremidade oposta, há desenvolvimento das raízes. As flores apresentam simetria bilateral e são compostas por três sépalas e três pétalas, sendo uma das pétalas modificada formando o labelo. Seus órgãos reprodutores, gineceu e androceu, são fundidos, originando a coluna (VAN DEN BERG & AZEVEDO, 2005).

O gênero *Cattleya* Lindl. é um dos mais importantes da família Orchidaceae em decorrência do seu elevado valor ornamental. Porém, exemplares de muitas espécies são obtidos de forma extrativista (CRUZ *et al.*, 2003), o que acarreta a redução no tamanho de muitas populações naturais, como é o caso da *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (CRUZ *et al.*, 2011).

Segundo Cruz *et al.* (2003; 2011), *C. elongata* é endêmica da Chapada Diamantina – BA e a única espécie exclusivamente rupícola pertencente a este gênero. Na natureza, é encontrada em populações numerosas nos campos rupestres da Chapada Diamantina, sendo facilmente reconhecida por apresentar pseudobulbos cilíndricos alongados e flores grandes vermelho-amarronzadas, de labelo magenta (TOSCANO-DE-BRITO & CRIBB, 2005; AZEVEDO & VAN DEN BERG, 2007).

Como muitas das populações de fácil acesso foram fortemente afetadas pela coleta predatória e degradação de habitats (CRUZ *et al.*, 2011) e a espécie *C. elongata* é citada no apêndice II do CITES (2013) é necessário realizar a conservação, de modo a evitar perda das informações genéticas. Neste contexto, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta porque permite conservar o germoplasma *in vitro*, sob a forma de ápices caulinares, hastes, embriões zigóticos, embriões somáticos e/ou caule (ELIAS FERREIRA *et al.*, 1998), bem como realizar a propagação em larga escala, para abastecer o mercado ornamental de forma sustentável.

Embora os padrões de germinação e crescimento observados nas orquídeas cultivadas *in vivo* sejam similares aos observados durante o cultivo *in vitro*, neste último caso não é necessária associação com fungos micorrízicos. Isso ocorre porque o meio nutritivo contém água e substâncias essenciais ao desenvolvimento embrionário. Segundo Faria *et al.* (2012), as formulações Knudson C (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige & Skoog (1962) são as mais utilizadas na germinação, assim como no crescimento e multiplicação dessas plantas.

Na composição dos meios nutritivos são listadas substâncias exigidas em maior quantidade para o desenvolvimento do material vegetal, os macronutrientes. Pertencem a este grupo o fósforo, o magnésio, o nitrogênio, o cálcio, o potássio e o ferro, os quais são adicionados principalmente na forma de sais inorgânicos. As substâncias requeridas em menor quantidade são denominadas de micronutrientes, sendo estas: o manganês, o zinco, o boro, o cobre, o cloro, o molibdênio, o cobalto e o iodo. Outro componente essencial do meio nutritivo são as vitaminas, sendo a tiamina, o ácido nicotínico e a piridoxina as mais frequentemente utilizadas (ARDITTI & ERNEST, 1992; GEORGE, 1993; CALDAS *et al.*, 1998; FARIA *et al.*, 2012).

Nos meios nutritivos a fonte de carboidrato mais comumente empregada é a sacarose, embora também possa ser utilizada a frutose, a glicose, a celobiose, a maltose, a rafinose ou a galactose (ARDITTI & ERNEST, 1992; CALDAS *et al.*, 1998; Faria *et al.*, 2012). Segundo Faria *et al.* (2012), geralmente são incorporadas ao meio nutritivo de 20 a 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose para o cultivo de orquídeas, no entanto, a concentração utilizada pode variar a depender da espécie de orquídea e da composição do meio nutritivo (Tabela 01).

**Tabela 01:** Estudos realizados sobre a utilização de diferentes concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de orquídeas, sendo obtidos resultados satisfatórios.

Espécie	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Referências
<i>Oncidium varicosum</i>	60	Rego-Oliveira <i>et al.</i> (2003)
<i>Dendrobium nobile</i>	60	Faria <i>et al.</i> (2004)
<i>Oncidium baueri</i>	40	Sorace <i>et al.</i> (2008)
<i>Cattleya walkeriana</i>	15	Dignart <i>et al.</i> (2009)
<i>Miltonia flavescens</i>	30 ou 45	Besson <i>et al.</i> (2010)
<i>Caularthron bicornutum</i>	13 a 29	Pivetta <i>et al.</i> (2010)
<i>Cattleya violaceae</i>	27	Galdiano Junior <i>et al.</i> (2012b)

O interesse sobre este tema é explicado, em parte, porque as células, tecidos e plantas cultivados *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> suficientes para realizar a fotossíntese, de maneira a promover seu crescimento (CALDAS *et al.*, 1998). Sendo assim, as fontes de carboidrato irão fornecer a energia metabólica necessária ao crescimento das plantas.

Os componentes dos meios tradicionais podem ser substituídos, em muitos casos, por água de coco, fertilizantes químicos, açúcar comercial, legumes e frutas, o que reduz os custos de produção (ARDITTI & ERNEST, 1992; CALDAS *et al.*, 1998; CAMPOS, 2002; STANCATO *et al.*, 2008; JUNGHANS *et al.*, 2009; FARIA *et al.*, 2012). A água de coco é bastante empregada no preparo do meio simplificado por conter açúcares, compostos orgânicos e nitrogenados, aminoácidos, enzimas e citocininas (CALDAS *et al.*, 1998; FARIA *et al.*, 2012) e, os fertilizantes, têm sido utilizados em substituição aos sais (COLOMBO *et al.*, 2012).

Dentre os frutos comumente testados, merece destaque a banana. Segundo Arditti & Ernest (1992), a polpa de banana apresenta altas concentrações de potássio, fósforo, magnésio e algumas vitaminas. Além disso, quando presente no meio nutritivo dispensa a utilização de nitratos (STANCATO *et al.*, 2008), substâncias tradicionalmente utilizados no preparo do meio MS e controladas pelo Ministério da Defesa (UNEMOTO *et al.*, 2007).

Herrmann *et al.* (2011) realizaram a germinação de *Brassavola tuberculata* em meio MS com metade das concentrações salinas, em meio Knudson e em meio simplificado. Aos 145, 175 e 235 dias de semeadura foi avaliada a matéria seca das plântulas. Foi observado que o meio simplificado promoveu melhor desenvolvimento das plântulas. Colombo *et al.* (2012) analisaram o efeito de diferentes fertilizantes comerciais e da polpa de banana no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis amabilis* x *Phalaenopsis equestris* e constataram que o meio composto por Biofert®, acrescido de polpa de banana pode ser utilizado durante o cultivo deste híbrido.

Estudos similares foram desenvolvidos por Rego-Oliveira & Faria (2005), Akter *et al.* (2007), Unemoto *et al.* (2007), Araújo *et al.* (2006 a), Akter *et al.* (2008), Figueiredo *et al.* (2008), Stancato *et al.* (2008), Pasqual *et al.* (2009), Pedrosa de Moraes *et al.* (2009), Vieira *et al.* (2009), Ferreira *et al.* (2010), Vyas *et al.* (2010), Asghar *et al.* (2011), Cunha *et al.* (2011), Galdiano Junior *et al.* (2012 a), Nambiar *et al.* (2012), Su *et al.* (2012), Soares *et al.* (2013), dentre outros, os quais constataram que diferentes espécies e híbridos de orquídeas podem ser propagados *in vitro* a partir de meio nutritivo simplificado.

Segundo George (1993), a adição de misturas complexas ao meio nutritivo simplificado pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores vegetais, o que contribui para propagação *in vitro*. No entanto, vale ressaltar que a utilização deste tipo de meio pode ser alvo de críticas porque a porcentagem nutricional dos componentes tende a variar, dificultando a reprodução dos resultados (ARDITTI & ERNEST, 1992; FARIA *et al.*, 2012).

Outros elementos, tais como reguladores vegetais, carvão ativado, antibióticos e fungicidas, também podem compor o meio nutritivo. A composição e a concentração do regulador vegetal utilizada são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria das plantas (CALDAS *et al.* 1998).

As classes de reguladores vegetais mais utilizadas na cultura de tecidos são as auxinas e as citocininas. Esses reguladores influenciam principalmente na multiplicação *in vitro*, porém Miyoshi & Mii (1995), Martini *et al.* (2001), Santos *et al.* (2007), Godo *et al.* (2010) e Vogel & Macedo (2011) já relataram sua eficiência durante a germinação.

A morfogênese *in vitro* pode ocorrer por meio da organogênese ou da embriogênese. Na organogênese, há formação de gemas adventícias e posterior formação da parte aérea, podendo ocorrer pela via direta ou indireta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Neste último caso, não ocorre formação de brotos a partir das células originais, visto que a formação do órgão é precedida pela formação de um calo (GEORGE, 1993).

Assim como a organogênese, a embriogênese pode ocorrer tanto pela via direta, quanto pela via indireta e, segundo Grattapaglia e Machado (1998), a grande maioria dos sistemas tende a ocorrer pela via indireta, sendo formados calos, os quais são mantidos ao longo da multiplicação. Na embriogênese as células irão se desenvolver por meio de diferentes estádios embriogenéticos, apresentando inicialmente estrutura bipolar, que originará uma planta inteira (GUERRA *et al.*, 1998). Segundo Kerbauy (1998) em certas orquídeas brasileiras, como *Catasetum* Kunth e gêneros afins, segmentos de ápices radiculares cultivados *in vitro* originam diretamente embriões somáticos (protocormóides). Já Suárez-Quijana *et al.* (2007) observaram formação de protocormóides de *Euchile mariae* cultivados *in vitro* a partir de protocormos.

Para realizar a multiplicação *in vitro* podem ser utilizadas diferentes fontes de material vegetal, a depender do objetivo do estudo. De forma geral, utiliza-se células meristemáticas, as quais são indiferenciadas e, portanto, capazes de regenerar uma planta inteira (KERBAUY, 1998). Chugh *et al.* (2009) relatam o uso de plântulas, folhas, caule, raízes e rizomas para o cultivo *in vitro* de orquídeas. Huang & Chung (2011), Ng & Saleh (2011) e Roy *et al.* (2011) utilizaram outro tipo de explante. Os primeiros autores utilizaram, gemas axilares de *Lycaste* e, os demais, utilizaram protocormos de *Paphiopedilum* e *Vanda coerulea* respectivamente, sendo obtidos resultados satisfatórios.

O tipo ideal de explante pode variar entre as espécies, pois as diferentes culturas tendem a apresentar variações de comportamento no decorrer do processo de multiplicação (GEORGE, 1993). Protocolos de regeneração de

orquídeas já foram estabelecidos por diversos autores (Tabela 02), os quais utilizaram diferentes explante e sugeriram a utilização de reguladores vegetais.

Apesar dos reguladores vegetais serem corriqueiramente utilizados no cultivo *in vitro*, nem sempre é necessário suplementar o meio nutritivo com estas substâncias para realizar a multiplicação de orquídeas. Vasudevan & Staden (2011) constataram que é possível multiplicar *Ansellia africana* sem o uso de reguladores vegetais, desde que se utilize o protocormo como explante. A ausência de regulador vegetal no meio nutritivo é um fato bastante positivo na multiplicação porque, além de reduzir os custos de produção, minimiza os riscos de variação genética, visto que as auxinas e citocininas estimulam a produção de calos quando em excesso no meio nutritivo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

**Tabela 02:** Estudos realizados sobre a multiplicação *in vitro* de Orchidaceae.

<b>Espécie</b>	<b>Referências</b>
<i>Dendrobium densiflorum</i>	Luo <i>et al.</i> (2008)
<i>Laelia speciosa</i>	Avila-Diaz <i>et al.</i> (2009)
<i>Guarianthe skinneri</i>	Coello <i>et al.</i> (2009)
<i>Encyclia mariae</i>	Diaz & Alvarez (2009)
<i>Phalaenopsis amabilis</i> e <i>Phalaenopsis</i> 'Nebula'	Gow <i>et al.</i> (2009)
<i>Malaxis acuminata</i>	Cheruvathur <i>et al.</i> (2010)
<i>Paphiopedilum villosum</i> var. <i>densissimum</i>	Long <i>et al.</i> (2010)
<i>Lycaste aromatica</i>	Mata-Rosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Oncidium flexuosum</i>	Mayer <i>et al.</i> (2010)
<i>Paphiopedilum rothschildianum</i>	Ng <i>et al.</i> (2010)
<i>Dendrobium nobile</i>	Vilela <i>et al.</i> (2010)
Híbrido de <i>Cymbidium</i>	Vyas <i>et al.</i> (2010)
Híbrido de <i>Lycaste</i>	Huang & Chung (2011)
<i>Paphiopedilum rothschildianum</i>	Ng & Saleh (2011)
<i>Vanilla planifolia</i>	Tan <i>et al.</i> (2011)
<i>Cyrtopodium glutiniferum</i>	Vogel & Macedo (2011)

O carvão ativado é outro componente tradicionalmente utilizado na propagação *in vitro* de orquídeas (Tabela 03). Quando presente no meio nutritivo, o carvão ativado facilita o enraizamento e promove a adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo explante, meio nutritivo, reguladores vegetais e/ou



outros compostos orgânicos, o que favorece o desenvolvimento da planta (ARDITTI & ERNEST, 1992; CALDAS *et al.*, 1998).

**Tabela 03:** Estudos realizados sobre o uso de diferentes concentrações de carvão ativado no cultivo *in vitro* de orquídeas.

Espécie	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Referências
<i>Cattleya walkeriana</i>	2,0	Faria <i>et al.</i> (2002)
<i>Laelia tenebrosa</i>	2,0	Araujo <i>et al.</i> (2006b)
<i>Miltonia flavescens</i>	1,0 ou 2,0	Chapha <i>et al.</i> (2009)
<i>Cattleya loddigesii</i>	2,0	Galdiano Junior <i>et al.</i> (2012b)
<i>Cattleya pumila</i>	2,0	Guson <i>et al.</i> (2012)
<i>Cattleya forbesii</i> e <i>Cattleya harrisoniana</i>	2,5	Schneiders <i>et al.</i> (2012)
<i>Brassavola tuberculata</i>	4,5	Soares <i>et al.</i> (2012)

A consistência do meio nutritivo pode ser líquida ou semi-sólida. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e Faria *et al.* (2012) as vantagens da utilização do meio em estado líquido são a facilidade no preparo, a redução do custo e maior disponibilidade de nutrientes para planta. A utilização de meio nutritivo sob tais condições já se tornou um método confiável para propagação massal em curto intervalo de tempo. No cultivo *in vitro* de orquídeas, o seu êxito já foi constatado por Samarfard *et al.* (2013), Jain & Babar (2005), Faria *et al.* (2006), Fialho *et al.* (2011) e Galdino-Junior *et al.* (2012c).

Apesar da utilização do meio nutritivo em estado líquido ter vantagens, algumas espécies podem não se desenvolver bem sob tais condições de cultivo, principalmente em decorrência da dificuldade de oxigenação dos tecidos vegetais. Nesses casos, é recomendado a utilização de um suporte que mantenha o material vegetal emerso sobre o meio ou manter o meio sob agitação, de modo a favorecer a oxigenação. Isso faz com que haja uma tendência a utilização do meio em estado semi-sólido, sendo o ágar a substância tradicionalmente utilizada para prover a consistência ideal do meio nutritivo (FARIA *et al.*, 2012).

Embora já tenham sido desenvolvidos vários estudos sobre a propagação *in vitro* de orquídeas, não há um protocolo estabelecido para a família Orchidaceae. Isso ocorre porque as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que ocorrem nas plantas *in vivo*, são mantidas nas cultivadas *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Sendo assim, há uma relação espécie-específica e a

composição do meio nutritivo tende a ser modificada para atender as necessidades de cada espécie.

As culturas mantidas *in vitro* podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies, para abastecer o mercado ornamental e/ou realizar a conservação em bancos ativos de germoplasma (BAGs). Nos dois primeiros casos, é necessário realizar a transferência das plantas mantidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. A adaptação a esta nova condição de cultivo é delicada devido, principalmente, aos seguintes fatores: temperatura, luminosidade, umidade, nutrientes e substrato (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Assis *et al.* (2005), Colombo *et al.* (2005) e Lone *et al.* (2008), o xaxim desfibrado e o esfagno são os substratos rotineiramente utilizados na aclimatização de orquídeas. Porém, estes substratos são extraídos de uma samambaiçu (*Dicksonia sellowiana*) e de um musgo, respectivamente, e ambos estão em risco de extinção.

Colombo *et al.* (2005) constataram que o substrato pó de coco é indicado para aclimatização do híbrido *Cattleya chocolate drop* x (*C. guttata* x *L. tenebrosa*). Lone *et al.* (2008) verificaram que o substrato fibra de coco ou fibra de coco + casca de *Pinus* (1:1) são indicados para substituir o xaxim e o esfagno durante o processo de aclimatização de *Cattleya intermedia*. Dorneles & Trevelin (2011) estudando a mesma espécie obtiveram baixa porcentagem de sobrevivência para plantas aclimatizadas em substrato de *Pinus*, em comparação ao substrato esfagno. Sorace *et al.* (2009), constataram que todos os substratos testados podem ser utilizados na aclimatização do híbrido *Cattleya intermedia* x *Hadrolaelia purpurata*, em substituição ao xaxim.

Outros estudos sobre aclimatização de orquídeas já foram desenvolvidos (Tabela 04). De forma geral, são utilizados substratos de origem vegetal, como fibra ou pó de coco e casca de *Pinus*, ou de origem mineral, a exemplo da pedra brita, argila e carvão vegetal. Esses substratos apresentam textura relativamente grossa e/ou drenagem livre (DEMATÊ & DEMATÊ, 1996), o que permite as raízes fácil acesso ao oxigênio e a luz, permitindo um desenvolvimento satisfatório da planta.

**Tabela 04:** Estudos realizados sobre a aclimatização de orquídeas, utilizando substratos ecologicamente corretos.

Espécie	Substrato	Referências
Orquídeas epífitas	"Coxim" puro "Coxim" + carvão vegetal "Coxim" + <i>Eucalyptus grandis</i>	Dematê & Dematê (1996)
<i>Dendrobium nobile</i>	Vermiculita + plantmax (2:1) Plantmax + carvão vegetal + isopor moído (1:1:1)	Moraes <i>et al.</i> (2002)
<i>Dendrobium nobile</i>	Coco desfibrado Coco em pó + coco em cubos	Assis <i>et al.</i> (2005)
<i>Miltonia flavescens</i>	Pó de coco Casca de <i>Pinus</i>	Muller <i>et al.</i> (2007)
<i>Laelia speciosa</i>	Casca de <i>Pinus</i>	Avilia-Diaz <i>et al.</i> (2009)
<i>Miltonia flavescens</i>	Casca de <i>Pinus</i>	Stefanello <i>et al.</i> (2009)
<i>Paphiopedilum villosum var. densissimum</i>	Turfa	Long <i>et al.</i> (2010)
<i>Lycaste aromatica</i>	Casca de <i>Pinus</i> + carvão vegetal + pedra pomes (3:1:1)	Mata-Rosas <i>et al.</i> (2010)
<i>Cattleya intermedia</i>	Casca de <i>Pinus</i>	Dornelles & Trevelin (2011)
Híbrido de <i>Lycaste</i>	Casca de coco seco + tijolo e folha (1:1:1)	Huang & Chung (2011)

Quando as culturas mantidas *in vitro* são utilizadas para fins de conservação, as informações adquiridas acerca do estabelecimento e da multiplicação *in vitro* são de grande importância (GEORGE, 1993). Tais informações favorecem a manutenção dos acessos no BAG *in vitro*, os quais caracterizam-se por permitir a conservação do germoplasma sob condições assépticas, facilitar o intercâmbio do material entre grupos de pesquisa, permitir menor risco de erosão genética e demandar menor investimento com manutenção e espaço físico, em comparação à conservação *in situ* (ENGELMANN, 1991; WITHERS & WILLIAMS, 1998; SÁNCHEZ-CHIANG & JIMÉNEZ, 2010). Para realização da análise da variabilidade genética do BAG *in vitro*, bem como da estabilidade genética, a biologia molecular é uma importante aliada.

Os primeiros marcadores moleculares utilizados para detecção da variabilidade genética, denominados marcadores enzimáticos, datam da década de 60 e baseavam-se na identificação de polimorfismo a partir da carga elétrica de proteínas (BERED *et al.*, 1997). No entanto, a partir de 1987, houve um grande avanço nos estudos genéticos em decorrência da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O emprego da técnica de PCR permite realizar a produção de múltiplas

cópias de sequências específicas de DNA, sem a necessidade de clonar estes seguimentos (ALBERTS *et al.*, 2010), o que propiciou o surgimento de outros tipos de marcadores.

Em marcadores dominantes, os alelos são revelados pela presença/ausência de bandas, sendo que cada uma destas bandas corresponde ao resultado da amplificação de determinados fragmentos de moléculas de DNA. Porém, não é possível identificar se o fragmento amplificado corresponde a um homozigoto dominante ou heterozigoto, sendo considerado menos informativo do que os codominantes.

Dentre os marcadores dominantes, o ISSR (*Intersimple sequence repeats*) vem sendo comumente utilizado para estudos genéticos em plantas e, para representantes da família Orchidaceae, seu uso já foi relatado por diversos autores (Tabela 05). O emprego desta técnica envolve a amplificação de segmentos de DNA que se localizam entre regiões repetidas de microssatélites, idênticas e orientadas em direções opostas (REDDY *et al.*, 2002).

**Tabela 05:** Estudos realizados sobre análise da diversidade genética de espécies de orquídeas, a partir de marcador ISSR.

<b>Espécie</b>	<b>Referências</b>
<i>Tipularia discolor</i>	Smith <i>et al.</i> (2002)
<i>Dendrobium officinale</i>	Shen <i>et al.</i> (2006)
<i>Cymbidium goeringii</i>	Yao <i>et al.</i> (2007)
<i>Piperia yadonii</i>	George <i>et al.</i> (2009)
<i>Aerides vandarum X Vanda stangeana</i>	Kishor & Devi (2009)
<i>Vanilla ssp.</i>	Verma <i>et al.</i> (2009)
<i>Dendrobium ssp.</i>	Wang <i>et al.</i> (2009a)
<i>Cymbidium goeringii</i>	Wang <i>et al.</i> (2009 b)
<i>Cattleya elongata</i>	Cruz <i>et al.</i> (2011)
<i>Dendrobium moniliforme e D. officinale</i>	Lu <i>et al.</i> (2012)
<i>Cattleya labiata</i>	Pinheiro <i>et al.</i> (2012)

A utilização deste tipo de marcador demanda baixo custo, pouca infraestrutura e pequena quantidade de DNA, apresenta alta reprodutibilidade e

polimorfismo, bem como rapidez na obtenção de informações a cerca da diversidade genética em comparação a outros tipos de marcadores. Sendo assim, à medida que houver necessidade em proteger o germoplasma de espécies ou híbridos, o marcador ISSR apresenta importante papel porque apresenta boa eficiência em distinguir variabilidade entre indivíduos mesmo que estes sejam estreitamente relacionados (REDDY *et al.*, 2002).

Uma vez que sabemos da valorização das orquídeas no mercado ornamental, bem como o interesse desse mercado por espécies nativas não podemos desprezar o potencial da flora baiana. A maioria dos estudos desenvolvidos sobre a família Orchidaceae no Estado da Bahia abordam aspectos relacionados à taxonomia e sistemática e, embora muitas espécies estejam ameaçadas de extinção, pouco se sabe sobre a propagação e a conservação das espécies.

Deste modo, o presente trabalho visa contribuir com a conservação da espécie *Cattleya elongata*, bem como estabelecer metodologias que permitam abastecer o mercado ornamental de forma sustentável. Para tanto foi realizado neste trabalho o estudo do estabelecimento *in vitro*, da multiplicação, da aclimatização e da análise da variabilidade genética do BAG *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia.

## REFERÊNCIAS

- AKTER, S.; NASIRUDDIN, K.M.; KHALDUN, A.B.M. 2007. Organogenesis of *Dendrobium* Orchid using traditional media and organic extracts. **Journal of Agriculture & Rural Development**, **5 (1, 2)**: 30-35.
- AKTER, S.; NASIRUDDIN, K.M.; HOSSAIN, K. 2008. Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid. **Journal of Agriculture & Rural Development**, **6 (1, 2)**: 69-74.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed. pp. 1396.
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F.C. 2006 a. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas. **Revista Ceres**, **53 (310)**: 608-613.
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R.; ROCHA, H.S. 2006 b. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, **2 (2)**: 61-67.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. 1992. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons Inc. 682 p.
- ASGHAR, S.; AHMAD, T.; HAFIZ, I.A.; YASEEN, M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma White. **African Journal of Biotechnology**, **10 (16)**: 3097-3103
- ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.; COLOMBO, L.A.; RODRIGUES PORTELA DE CARVALHO, J.F. 2005. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**, **27 (2)**: 255-260.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **99**: 335-343.
- AZEVEDO, C.O.; VAN DEN BERG, C. 2007. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, **34 (1)**: 1-47.
- BARROS, F. 1990. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae Brasileiras. **Acta bot. bras.**, **4 (1)**: 177-187.

- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N. 2010. Orchidaceae. *In*: FORZZA, R.C. *et al.* (Orgs.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. pp.1344- 1426.
- BERED, F.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F. 1997. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, **27 (3)**: 513-520.
- BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT, L.P.; STEFANELLO, S. 2010. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, **8 (1)**: 09-13.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 87-132.
- CAMPOS, D.M. 2002. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. 143 p.
- CHAPLA, P.I.; BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; SILVA, J.M.; ROCHA, A.C.S.; STEFANELLO, S. 2009. pH, carvão ativado e agentes gelificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, **5 (2)**: 87-93.
- CHERUVATHUR, M.K.; ABRAHAM, J.; MANI, B.; THOMAS, T.D. 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explantes of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **101**: 163-170.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I.U. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, **122**: 507-520.
- COELLO, C.Y.; MICELI, C.L.; ORANTES, C.; DENDOOVENS, L.; GUTIÉRREZ, F.A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. **Gayana Botánica**, **67 (1)**: 19-26.
- COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; FONSECA, C.B. 2005. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, **27 (1)**: 145-150.

- COLOMBO, R.C.; FAVETTA, V.; FARIA, R.T. 2012. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, **59 (6)**: 873-876.
- CRUZ, D.T.C.; BORBA, E.D.; VAN DEN BERG, C. 2003. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus: série Ciências Agrárias**, **3 (1, 2)**: 26-34.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **294**: 87-98.
- CUNHA, T.; CORDEIRO, G.M.; MASSARO, R.; DEZAN, L.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. 2011. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, **7 (8)**: 1-5.
- DEMATÊ, J. B. I.; DEMATÊ, M. E. S. P. 1996. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **31 (11)**: 803-813.
- DÍAZ, M.S.S.; ÁLVAREZ, C.C. 2009. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, **45**: 162-170.
- DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. 2009. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, **33 (3)**: 780-787.
- DORNELES, L.T.; TREVELIN, V. 2011. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **IHERINGIA**, **66 (2)**: 167-174,
- DRESSLER, R.L. 2005. How many orchid species? **Selbyana**, **26 (1, 2)**: 155-158.
- ELIAS FERREIRA, M.; CALDAS, S.L.; PEREIRA, E.A. 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. p. 21-43.
- ENGELMANN, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germoplasma – a review. **Euphytica**, **57**: 227-243.



- FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; BRIGATTO, U. 2002. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, **2 (3)**: 489-492.
- FARIA, R.T.; VICENTE, A.P.R.M.; COSTA, T.M.M.; FONSECA, I.C.B.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A. 2004. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, **25 (4)**: 309-314.
- FARIA, R.T.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO, L.K.; SILVA, G.L. 2006. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum Agronomy**, **28 (1)**: 71-74.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. 2012. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenasa. 116p.
- FERREIRA, A.W.C.; LIMA, M.I.S.; FARIA, R.T.; RIBEIRO, J.P.N.; CASALI, C.A. 2010. Propagação *in vitro* de *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro (*Oncidium pubes* Lindl.) (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, **24 (3)**: 636-639.
- FIALHO, G.S.; VALE, J.C.; SOBREIRA, F.M.; SCHMILDT, E.R. 2011. Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. **IDESIA**, **29 (1)**: 103-105.
- FIGUEIREDO, M.A.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, **38 (1)**: 255-257.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.M.; LEMOS, E.G.M. 2012 a. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. **Scientiae**, **3 (3)**: 210-214.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K.F.L.; LEMOS, E.G.M. 2012 b. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, **42 (5)**: 801-807.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E.G.M. 2012 c. Seleção de agentes alternativos ao ágar para propagação de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, **07**: 756-760.

- GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. England: Exegetics Limited. 554 p.
- GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V.L. 2009. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, **96 (11)**: 2022-2030.
- GODO, T.; KOMORI, M.; NAKAOKI, E.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K. 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, **46**: 323-328.
- GOW, W.P.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. 2010. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. **Acta Physiologiae Plantarum**, **32**: 621-627.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 183-260.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1998. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 533-568.
- GUSON, R.R.; MORAES, C.P.; RONCONI, C.C. 2012. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* HOOK. **Revista de Agronegócios e Meio Ambiente**, **5 (3)**: 551-563.
- HERRMANN, M.H.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. 2011. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, **17 (1, 4)**: 162-166.
- HUANG, C.; CHUNG, J. 2011. Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **106**: 31-38.
- JAIN, R.; BABAR, R. B. 2005. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling alternative agent for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. **Current Science**, **88 (2)**: 292-295.

- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, F.V.D. 2009. Redução de custos na micropropagação. *In*: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA. pp.153-175.
- KERBAUY, G.B. 1998. Competências e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 519-532.
- KISHOR, R.; DEVI, H.S. 2009. Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f 3 *Vanda stangeana* Reichb.f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **97**: 121-129.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orquid Society Bulletin**, **14**: 214-217.
- KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R. 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, **33 (2)**: 177-184.
- LONE, A.B.; BARBOSA, C.M.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T. 2008. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, **30 (4)**: 465-469.
- LONG, B.; NIEMIARA, A.X.; CHENG, Z.; LONG, C. 2010. In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **101**: 151-162.
- LU, J.J.; ZHA, H.Y.; SUO, N.N.; WANG, S.; SHEN, B.; WANG, H.Z.; LIU, J.J. 2012. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, **137**: 1-10.
- LUO, J.P.; WANG, Y.; ZHA, X.Q.; HUANG, L. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **93**: 333-340.
- MARTINI, P. C.; WILLANDINO, L.; ALVES, G. D.; DONATO, V. T. S. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **36 (10)**: 1319-1324.

- MATA-ROSA, M.; BALTAZAR-GARCÍA, R.J.; MOON, P.; HIETZ, P.; LUNA-MONTERROJO, V.E. 2010. In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. **Plant Biotechnol Rep, 4**: 157-163.
- MAYER, J.L.S.; STANCATO, G.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2010. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult, 103**: 411-416.
- MIYOSHI, K.; MII, M. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae, 63**: 263-267.
- MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. 2002. Substratos para aclimatização de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum, 24 (5)**: 1397-1400.
- MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. 2006. Effect of activated charcoal for seedlings development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences, 1 (4)**: 388-391.
- MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A.R.; STEFANELLO, S. 2007. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências, 5 (2)**: 252-254.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum, 15**: 473-497.
- NAMBIAR, N.; TEE, C.S.; MAZIAH, M. 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium* Alya Pink. **Plant Omics Journal, 5 (1)**: 10-18.
- NG, C.Y.; SALEH, N.M.; ZAMAN, F.Q. 2010. In vitro multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology, 9 (14)**: 2062-2068.
- NG, C.; SALEH, N. M. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 105**: 193-202.
- PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M. A.; REZENDE, J. C.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. 2009. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira, 27**: 211-216.

- PEDROSO DE MORAES, C.; SANTOS, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, **13 (2)**: 57-65.
- PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S.; PEREIRA, K.L.G.; DINIZ, L.E.C. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, **298**: 1815-1825.
- PIVETTA, K.F.L.; MARTINS, T.A.; GALDIANO JUNIOR, R.F.; GIMENES, R.; FARIA, R.T.; TAKANE, R.J. 2010. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural (on line)**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2010nahead/a718cr3023.pdf>. Acesso em: 04/10/2013.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, **128**: 9-17.
- REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.; SACONATO, C. 2003. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, **24 (2)**: 265-272.
- REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.F. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum Agronomy**, **27 (1)**: 1-5.
- ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. 2011. 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**, **128**: 325-331.
- SAMARFARD, S.; KADIR, M.A.; KADZIMIN, S.B.; RAVANFAR, S. SAUD, H.M. 2013. Genetic stability of *in vitro* multiplied *Phalaenopsis gigantea* protocorm-like bodies as affected by chitosan. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, **41 (1)**: 177-183.

- SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía Mesoamericana**, **21(1)**: 193-205.
- SANTOS, G.A.; SAITO, B.C.; MONTEIRO, D.P.; GUTIERRE, M.A.M.; ZONETTI, P.C. 2007. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **CESUMAR**, **9 (1)**: 07-12.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M.R.; SUZUKI, R.M. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, **59 (2)**: 185-191.
- SHEN, J.; DING, X.; LIU, D.; DING, G.; HE, J.; LI, X.; TANG, F.; CHU, B. 2006. Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA *et* MIGO. **Biol. Pharm. Bull.**, **29 (3)**: 420-422.
- SILVA, T.L.V. 2013. Orchidaceae no município de Jacobina, Bahia, Brasil. Monografia de Graduação. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 33 p.
- SMITH, J.L.; HUNTER, K.L.; HUNTER, R.B. 2002. Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. **SOUTHEASTERN NATURALIST**, **1(1)**: 17-26.
- SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; MACEDO, M.C.; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; ROSA, C.B.C.J. 2012. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, **24 (3)**: 226-233.
- SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SUZUKI, R.M.; SCALON, S.P.Q.; ROSA JUNIOR, E.J. 2013. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, **31 (1)**: 63-67.
- SORACE, M.; FARIA, R.T.; JÚNIOR, C.V.D.; GOMES, G.P.; BARBOSA, C.M.; VIEIRA, F.G.N.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A.; SCHNITZER, J.A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, **29 (4)**: 775-782.
- SORACE, M.; FARIA, R.F.; FONSECA, I.C.B.; YAMAMOTO, L.Y.; SORACE, M.A.F. 2009. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya*

- intermedia* X *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias, 30 (4):** 771-778.
- STANCATO, G.C.; FARIA, R.T. 1996. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae). I: effects of macro and microelements. **Lindleyana, 11:** 41-43.
- STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia, 67 (1):** 51-57.
- STEFANELLO, S.; SILVEIRA, E.V.; OLIVEIRA, L.K.; BESSON, J.C.F.; DUTRA, G.M.N. 2009. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* LINDL. propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, 2 (3):** 467-476.
- SU, M.J.; SCHNITZER, J.A.; FARIA, R.T. 2012. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica, 4 (1):** 28-34.
- SUÁREZ-QUIJADA, I.; SANDOVAL-ZAPOTITLA, E.; HERNÁNDEZ-ALTAMIRANO, M.; CHÁVEZ-ÁVILA, V. M. 2007. Determinación histológica de regenerantes de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (Orchidaceae), obtenidos a partir de protocormos cultivados *in vitro*. **Lankesteriana, 7 (1, 2):** 394-397.
- TAN, B.C.; CHIN, C.F.; ALDERSON, P. 2011. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 105:** 457-463.
- TOSCANO-DE-BRITO, A.; CRIBB, J.C. 2005. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. São Paulo: Nova Fronteira. 400 p.
- UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. 2007. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência, 13 (2):** 267-269.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. 1949. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette, 110:** 605-617.
- VAN DEN BERG, C.; AZEVEDO, C.O. 2005. Orquídeas. In: JUNCÁ, F.A.; FUCH, L.; ROCHA, W. (Orgs.). **Diversidade e conservação da Chapada Diamantina**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. pp. 195-208.
- VASUDEVAN, R.; STADEN, J.V. 2011. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell Tiss Organ Cult, 107:** 123-129.

- VERMA, P.C.; CHAKRABARTY, D.; JENA, S.N.; MISHRA, D.K.; SINGH, P.K.; SAWANT, S.V.; TULI, R. 2009. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: comparative results for RAPD and ISSR. *Industrial Crops and Products*, **29**: 581-589.
- VIEIRA, J.G.J.; UNEMOTO, L.K.; YAMAKAMI, J.K.; NAGASHIMA, G.T.; FARIA, R.T.; AGUIAR, R.S. 2009. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, **37** (1): 48-52.
- VILELA, X.M.S.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; ARAÚJO, A.G. 2010. Tipos de pseudobulbos e número de nós no enraizamento e brotação de *Dendrobium nobile*. **Dourados**, **3** (7): 01-07.
- VOGEL, I.N.; MACEDO, A.F. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **104**: 147-155.
- VYAS, S.; GUHA, S.; KAPOOR, P.; RAO, I.U. 2010. Micropropagation of *Cymbidium* Sleeping Nymph through protocorm-like bodies production by thin cell layer culture. **Scientia Horticulturae**, **123**: 551-557.
- WANG, H.Z.; FENG, S.G.; LU, J.J.; SHI, N.N.; LIU, J.J. 2009 a. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, **122**: 440-447.
- WANG, H.Z.; WU, Z.X.; LU, J.J.; SHI, N.N.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.T.; LIU, J.J. 2009 b. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genética**, **136**: 391-399.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T.. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 87-132.
- YAO, X.; GAO, L.; YANG, B. 2007. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. **Front. Biol.**, **2** (4): 419-424.





## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a cultura de tecidos vegetais como uma alternativa para a propagação e conservação de *Cattleya elongata*.

### Objetivos específicos

- 1- Testar se o processo de desinfestação das cápsulas e das semnetes, a composição do meio nutritivo e o carvão ativado interferem na germinação *in vitro*;
- 2- Avaliar se a composição do meio nutritivo e o carvão ativado interferem no crescimento *in vitro*;
- 3- Realizar a análise molecular de plantas germinadas *in vitro* para avaliar a representatividade do banco de germoplasma (BAG) *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia;
- 4- Testar se a composição dos substratos interfere no processo de aclimatização;
- 5- Avaliar se os tipos de explantes testados, bem como os reguladores vegetais ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina interferem na micropropagação;
- 6- Testar se a consistência do meio nutritivo interfere na micropropagação.

## CAPÍTULO 01

Estabelecimento *in vitro*, caracterização genética de indivíduos e aclimatização de *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae)

**O artigo será enviado para *Genetic Resources and Crop Evolution*.**

## RESUMO

*Catleya elongata* é uma espécie de ocorrência restrita a Chapada Diamantina – BA, cujas populações tem sido reduzidas pelo extrativismo e pela degradação de habitats. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer culturas de *C. elongata in vitro* para fins de conservação. Além disso, foi estabelecida uma metodologia que permitiu transferir as plantas mantidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. Na germinação *in vitro* foi testada a influência da desinfestação do material vegetal, dos componentes do meio nutritivo e do carvão ativado na germinabilidade. No crescimento *in vitro* foi avaliada a influência da composição do meio nutritivo e do carvão ativado na sobrevivência e no desenvolvimento da plântula. Para avaliação da representatividade do banco de germoplasma (BAG) *in vitro* foram selecionadas 86 plantas, sendo a variabilidade genética analisada através de marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeats*). Na aclimatização foi testada a influência de diferentes substratos no cultivo *ex vitro*. Para estabelecer plantas de *C. elongata in vitro*, deve-se realizar a desinfestação da cápsula e inocular as sementes diretamente em meio Murashige & Skoog (1962) (MS) a 3% de sacarose ou em meio simplificado. Para promover o desenvolvimento da parte aérea sugere-se a utilização do meio MS com metade das concentrações salinas a 1,5% de sacarose ou do meio simplificado, ambos suplementados com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Para induzir o enraizamento, as plântulas devem ser cultivadas em meio simplificado, suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O banco criado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia é eficiente para conservar o germoplasma da espécie, visto que é representativo em comparação às populações naturais. A aclimatização deve ser realizada em substrato composto por casca de *Pinus* e fibra de coco (1:1).

**PALAVRAS-CHAVE:** Orquídea; germinação *in vitro*; crescimento *in vitro*; BAG *in vitro*; cultivo *ex vitro*.

## ABSTRACT

*Catleya elongata* is a species of restricted occurrence in Chapada Diamantina - BA, whose populations have been reduced by extractivism and habitat degradation. The objective of this study was to establish in vitro cultures of *C. elongata* for conservation purposes. In addition, a methodology was established which allowed the transfer of plants maintained in vitro to the ex vitro environment. For in vitro germination were tested the influence of disinfection of the plant material, the components of nutrient medium and activated charcoal in germination. For in vitro growth were evaluated the influence of the composition of the nutrient medium and activated charcoal on the development and survival of seedlings. To assess the representativeness of the in vitro germplasm bank (BAG), 86 plants were selected and the genetic variability was analyzed using ISSR (inter simple sequence repeats) markers. In the acclimatization process was tested the influence of different substrates on the ex vitro cultivation. To establish in vitro plants of *C. elongata*, one should perform the disinfection of the capsule and inoculate the seeds directly in the Murashige Skoog (1962) medium with 3% of sucrose or in simplified medium. To promote the development of the aerial part of the seedlings it is advisable to use the MS medium with half concentration of salts with 1,5% of sucrose or simplified medium, both supplemented with 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. To induce the rooting, the seedlings must be grown in simplified medium supplemented with 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. The in vitro BAG of the Laboratorio de Cultura de Tecidos Vegetais of Universidade Federal da Bahia is efficient to conserve germplasm because of its representativeness in relation to natural populations. Acclimatization should be performed in a substrate composed by *Pinus* bark and coconut fiber (1:1).

**KEYWORDS:** Orchid; in vitro germination; in vitro growth; in vitro BAG ; ex vitro cultivation.

## INTRODUÇÃO

*Cattleya elongata* Barb. Rodr. é uma espécie de ocorrência restrita a região da Chapada Diamantina e de hábito exclusivamente rupícola (CRUZ *et al.*, 2003; 2011). Na natureza é facilmente reconhecida por apresentar pseudobulbos cilíndricos alongados e flores grandes vermelho-amarronzadas, de labelo magenta (TOSCANO-DE-BRITO & CRIBB, 2005; AZEVEDO & VAN DEN BERG, 2007), o que lhe atribui elevado potencial ornamental. Porém, o extrativismo e a degradação de habitats vêm reduzindo o tamanho de muitas populações naturais (CRUZ *et al.*, 2011), o que torna necessário realizar a conservação da espécie.

Segundo Rao (2004), existem duas abordagens para conservação do germoplasma, a *in situ* e a *ex situ*. Quando conservadas *in situ*, as coleções são mantidas em seu habitat natural. Desta forma, elas ficam vulneráveis a eventos climáticos, ataques de pragas e patógenos (ENGELMANN & DUSSERT, 2000; ENGELMANN, 2004; RAO, 2004), o que aumenta o risco de perda das informações genéticas. Além disso, os custos com a mão de obra são elevados e é difícil realizar o intercâmbio de germoplasma. Neste contexto, a conservação *ex situ* é uma ferramenta complementar para conservar o germoplasma.

A conservação *ex situ* pode ser realizada por meio de coleções *in vivo*, banco de sementes, criopreservação e bancos de germoplasma (BAG) *in vitro*. Os BAGs *in vitro* são geralmente utilizados para conservação de espécies recalcitrantes ou de difícil propagação e, quando o germoplasma é mantido esta condição, há menor investimento com manutenção, demanda menor espaço físico, há menor risco de erosão genética, o material é conservado sob condições assépticas e o intercâmbio é facilitado, em comparação à conservação *in situ* (ENGELMANN, 1991; WITHERS & WILLIAMS, 1998; SÁNCHEZ-CHIANG & JIMÉNEZ, 2010).

É essencial que as coleções mantidas nos BAGs *in vitro* apresentem variabilidade genética, assim como essa variabilidade seja representativa em relação às populações naturais. Para analisar a variabilidade genética das coleções, técnicas de biologia molecular são rotineiramente empregadas. Em plantas, o marcador ISSR (*Inter simple sequence repeats*) é comumente utilizado, sendo que, para representantes da família Orchidaceae, seu uso já foi relatado por Smith *et al.* (2002), Shen *et al.* (2006), Yao *et al.* (2007), Kishor & Devi

(2009), Verma *et al.* (2009), Wang *et al.* (2009a; b), Cruz *et al.* (2011), Lu *et al.* (2012), Pinheiro *et al.* (2012). A utilização deste tipo de marcador demanda baixo custo, pouca infraestrutura e pequena quantidade de DNA, além de possibilitar alta reprodutibilidade, polimorfismo e rapidez na obtenção de informações acerca da diversidade genética, quando comparado a outros marcadores moleculares (REDDY *et al.*, 2002).

Estabelecidas as condições de cultivo *in vitro*, problemas relacionados à baixa taxa germinativa (SWARTS & DIXON, 2009) e ao crescimento lento (SUZUKI *et al.*, 2010) de orquídeas podem ser minimizados e o germoplasma da espécie pode ser conservado. Em contrapartida, um dos grandes desafios da cultura de tecidos é transferir essas plantas para o ambiente *ex vitro*.

Mahendran *et al.* (2013) relatam que um número considerável de mudas podem não conseguir sobreviver quando aclimatizadas. A adaptação a esta nova condição de cultivo é delicada devido a fatores como temperatura, luminosidade, umidade, nutrientes e substrato (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Embora ainda não haja uma metodologia que possa ser considerada padrão para família Orchidaceae, muitos trabalhos sobre aclimatização de orquídeas vêm sendo realizados (AVILIA-DIAZ *et al.*, 2009; SORACE *et al.*, 2009; STEFANELLO *et al.*, 2009; LONG *et al.*, 2010; MATA-ROSAS *et al.*, 2010; DORNELLES & TREVELIN, 2011; HUANG & CHUNG, 2011), inclusive Dorneles & Trevelin (2011) conseguiu reintroduzir em fragmentos de Mata Atlântica plantas de *Cattleya intermedia* propagadas *in vitro*.

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer culturas de *C. elongata* sob condições *in vitro*, sendo a variabilidade genética do BAG *in vitro* analisada através do marcador ISSR. Além disso, foi estabelecida uma metodologia que permitiu transferir as plantas mantidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Germinação *in vitro***

Duas cápsulas maduras de *C. elongata*, que não haviam sofrido deiscência, foram coletadas no município de Mucugê – BA e armazenadas em sacos de papel durante quinze dias a temperatura ambiente. Em laboratório, foi realizada a desinfestação das cápsulas com detergente neutro + água destilada por 10 minutos e, posteriormente, hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos. Em seguida, as cápsulas foram lavadas com água estéril (3x) e abertas, para retirada das sementes, as quais e foram separadas em dois lotes.

Aproximadamente 1 mg de sementes do lote 1 foi imediatamente inoculada em meio nutritivo (15 mL de meio/tubo). As sementes do lote 2 foram desinfestadas com álcool a 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos e lavadas com água estéril (3x). Alíquota homogênea de 500 µL de sementes do lote 2 + água estéril foi inoculada em meio nutritivo (15 mL de meio/tubo). Para estimar o número médio de sementes inoculadas foram retiradas três amostras durante a montagem do experimento, sendo contabilizado o número médio de sementes.

Foram testados os meios nutritivos simplificado (preparado com 50 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana, 50 g L<sup>-1</sup> de polpa de tomate, 50 g L<sup>-1</sup> de polpa de mamão, 120 mL L<sup>-1</sup> de água de coco e 3 mL L<sup>-1</sup> de adubo para orquídea NPK, na proporção 10:30:10) e Murashige & Skoog (1962) (MS) a 3% de sacarose, ambos na ausência e presença de carvão ativado (2 g L<sup>-1</sup>). Os meios nutritivos foram gelificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, o pH foi ajustado para 5.7 ± 1 e a esterilização ocorreu em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 X 2 (meio nutritivo X carvão ativado), contendo cinco repetições de aproximadamente 850 sementes para o lote 1 e 490 sementes para o lote 2, totalizando dez repetições. Após 95 dias, foi avaliada a germinabilidade (%), sendo considerada germinada a semente que desenvolveu protocormo.

### **Crescimento *in vitro***

As plântulas de *C. elongata* com aproximadamente 0,5 cm de comprimento da parte aérea, obtidas a partir da germinação *in vitro*, foram



repicadas, sendo testadas as seguintes composições de meio nutritivo: simplificado (como descrito anteriormente), Knudson (1946) a 2% de sacarose, MS a 3% de sacarose e MS com metade da concentração salina (MS/2) a 1,5% de sacarose. Os meios foram testados na ausência e presença de carvão ativado ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). Os meios nutritivos foram gelificados com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, o pH foi ajustado para  $5.7 \pm 1$  e a esterilização ocorreu em autoclave, a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial  $4 \times 2$  (meio nutritivo X carvão ativado), contendo cinco repetições de 20 amostras cada. Após seis meses, foram avaliadas os parâmetros sobrevivência (%), matéria seca da parte aérea (MSPA) (mg) e do sistema radicular (MSSR) (mg).

### **Condições de cultivo *in vitro***

Os experimentos realizados *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia e mantidos sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , luz fluorescente ( $60\mu\text{mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e fotoperíodo de 16 horas/luz.

### **Diversidade genética do banco de germoplasma**

Dentre as plantas de *C. elongata* cultivadas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 860 plantas foram selecionadas para compor o BAG *in vitro*. Estas foram obtidas por meio da germinação *in vitro*, sendo os frutos coletados em diferentes regiões da Chapada Diamantina – BA, Mucugê (ano 2008 e 2010), Morro do Chapéu e Campo Formoso. Para avaliar a diversidade genética do BAG *in vitro*, foram analisadas 86 plantas (10% do BAG *in vitro*), utilizando marcador ISSR.

O DNA foi extraído a partir de folhas e de raízes, utilizando o protocolo de brometo cetil-trimetil-amônio 2% (CTAB) de Doyle & Doyle (1987) adaptado para microtubos. As amplificações foram realizadas em um volume final de  $15 \mu\text{L}$ , contendo tampão de reação 1X,  $2,5\text{mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,5\text{mM}$  de primer,  $0,2\text{mM}$  dNTPs,  $0,75 \text{ U}$  de Taq DNA polimerase e DNA template. Foram testados 12 primer de ISSR descritos por Wolfe *et al.* (1998) e selecionados cinco com resolução satisfatória para análise: MAO (5'-CTC CTC CTC CTC RC-3'), MANNY

(5'-CAC CAC CAC CAC RC-3'), UBC 844 (5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRC-3'), UBC 901 (5'-GTG TGT GTG TGT YR-3') e AW3 (5'-GTG TGT GTG TGT RG-3').

A amplificação foi realizada a partir de uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida por 37 ciclos de 1 minuto a 94 °C, de 1 minuto a 44 °C (MANNY e UBC 844), 45 °C (MAO), 46 °C (AW3) ou 47 °C (UBC 901) e de 2 minutos a 72 °C, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. As reações de PCR foram visualizadas pela eletroforese no gel de agarose a 1,4% e corados com brometo de etídio,

A variabilidade genética existente entre os indivíduos foi estimada a partir da frequência alélica, porcentagem de *loci* polimórficos e heterozigotidade média esperada por *locus* (He).

### **Aclimatização**

As plantas de *C. elongata* estabelecidas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm de comprimento da parte aérea, foram inoculadas em meio simplificado suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar para induzir o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular. Após 3 meses, as plantas foram transferidas para meio MS/2 a 1,5% de sacarose, suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, e mantidas sob tais condições até a transferência para o ambiente *ex vitro*. Os meios nutritivos tiveram seu pH ajustado para 5.7 ± 1 e a esterilização ocorreu em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

Plantas com 3 cm de comprimento da parte aérea foram transferidas para o ambiente *ex vitro*. O cultivo ocorreu em garrafas pet de dois litros transparente. Estas foram cortadas, sendo a parte inferior utilizada como vaso e a parte superior encaixada sobre a parte inferior, na tentativa de manter a umidade do ar. Após sete dias, as tampas foram retiradas e, transcorridos mais sete dias, a porção superior das garrafas foi removida. Foram testados os substratos casca de *Pinus* + terra vegetal (1:1), fibra de coco + terra vegetal (1:1), casca de *Pinus* + fibra de coco (1:1) e casca de *Pinus* + fibra de coco + terra vegetal (1:1:1). Antes do preparo do substrato, a casca de *Pinus* foi colocada de molho em água por 24 horas, com o objetivo de minimizar o efeito de possíveis compostos fenólicos prejudiciais às plantas.

O experimento foi mantido sob sombreamento de 70%, a irrigação ocorreu manualmente duas vezes por semana (60 mL) e a adução foi realizada semanalmente com adubo NPK (10:30:10) (60 mL).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo quatro repetições de dez amostras cada. Após 40 dias de transferência, foram avaliadas os parâmetros sobrevivência (%), número de brotos e vigor, sendo este último mensurado visualmente tendo como base a coloração e o desenvolvimento das folhas e raízes.

### ***Análise estatística***

Para os três experimentos, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação *in vitro*

Os procedimentos utilizados para desinfestar o material vegetal de *C. elongata* foi eficiente, pois não houve contaminação. No entanto, as sementes tratadas diretamente com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 2,5% perderam a viabilidade, sugerindo que essas substâncias podem danificar o embrião.

O álcool, além de apresentar ação germicida, quando utilizado na concentração de 70 ou 80% apresenta também ação surfactante (SOUSA *et al.*, 2007), facilitando a penetração de agentes químicos nos tecidos. O tempo de exposição e concentração destes agentes são fatores determinantes no processo de desinfestação das sementes. Segundo Alvarez-Prado *et al.* (2006), a medida que aumenta a concentração e o tempo de exposição das sementes ao hipoclorito de sódio há redução da germinabilidade, sendo indicada a utilização de hipoclorito de sódio a 0,4% por cinco minutos para desinfestação de sementes de 11 espécies de orquídeas. Portanto, o embrião de *C. elongata* pode ter sido danificado em detrimento do alto tempo de exposição, bem como pela alta concentração de hipoclorito de sódio utilizada.

Embora o hipoclorito de sódio seja uma substância amplamente empregada na desinfestação de semente e explantes de orquídeas devido a facilidade de aquisição e pelo baixo custo (ASGHAR *et al.*, 2011), não há um protocolo estabelecido que atenda as exigências de todas as espécies. Isso ocorre porque fatores como tamanho, estrutura e ornamentação das sementes estão diretamente relacionados à tolerância aos agentes químicos (MILANESE, 1997). Porém, quando as cápsulas são colhidas antes da deiscência é necessário realizar apenas a desinfestação da superfície do fruto, pois as sementes, quando estão dentro da cápsula íntegra, encontram-se em um ambiente asséptico (FARIA *et al.*, 2012).

Ao realizar apenas a desinfestação das cápsulas de *C. elongata*, a germinação teve início após 30 dias de semeadura, quando houve formação dos protocormos (Figura 01).



**Figura 01:** Protocormos de *Cattleya elongata* obtidos a partir da germinação *in vitro*. Barra: 1 cm

Para germinação *in vitro* de *C. elongata* não houve interação significativa entre meio nutritivo X carvão ativado. A composição do meio nutritivo e o carvão ativado não influenciaram significativamente na germinabilidade (%) da espécie em estudo (Tabela 01).

**Tabela 01:** Valores médios para germinabilidade (%) de *Cattleya elongata*, em função de diferentes composições do meio nutritivo e de diferentes níveis de carvão ativado.

Meio nutritivo	Germinabilidade (%)		Média Geral
	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )		
	0,0	2,0	
MS a 3% de sacarose	45,5 aA	40,7 aA	43,1 a
Simplificado	39,4 aA	38,1 aA	38,8 a
Média Geral	42,5 A	39,5 A	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e pela mesma letra maiúscula em cada linha, para mesma variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Meios nutritivo com várias formulações são sugeridos para germinação *in vitro* de orquídeas, Knudson C (1946) (BEKTAS *et al.*, 2013; HOSSAIN *et al.*, 2013; MAHENDRAN *et al.*, 2013), Murashige e Skoog (1962) em diferentes

concentrações salinas (HOSSAIN *et al.*, 2013; MAHENDRAN *et al.*, 2013; PAUDEL *et al.*, 2012), Morel (1965) (MAHENDRAN *et al.*, 2013;), Phytamax (BEKTAS *et al.*, 2013; HOSSAIN *et al.*, 2013), Mitra *et al.* (HOSSAIN *et al.*, 2013), Orchimax (BEKTAS *et al.*, 2013), Lindeman *et al.* (1970) (BEKTAS *et al.*, 2013; MAHENDRAN *et al.*, 2013) e simplificado (HERRMANN *et al.*, 2011).

Além das variações nas concentrações de nutrientes, para o cultivo dessas plantas, os meios nutritivos tendem a ser suplementados com carvão ativado porque essa substância é capaz de adsorver substâncias inibitórias, como, por exemplo, os fenóis (ARDITTI & ERNST, 1992). Isso pode favorecer a germinação, pois segundo Dietrich (1986) *apud* Pereira *et al.* (2002), compostos fenólicos no tegumento das sementes fixam o O<sub>2</sub>, impedindo a sua chegada no interior das sementes.

### **Crescimento *in vitro***

Para variável sobrevivência (%) não houve interação significativa entre meio nutritivo X carvão ativado. A composição do meio nutritivo não influenciou este parâmetro, sendo observada de 89 a 93% de sobrevivência para a espécie em estudo (Tabela 02).

Em contrapartida, plântulas cultivadas em meio nutritivo suplementado com carvão ativado apresentaram maior porcentagem de sobrevivência (93%) (Tabela 02).

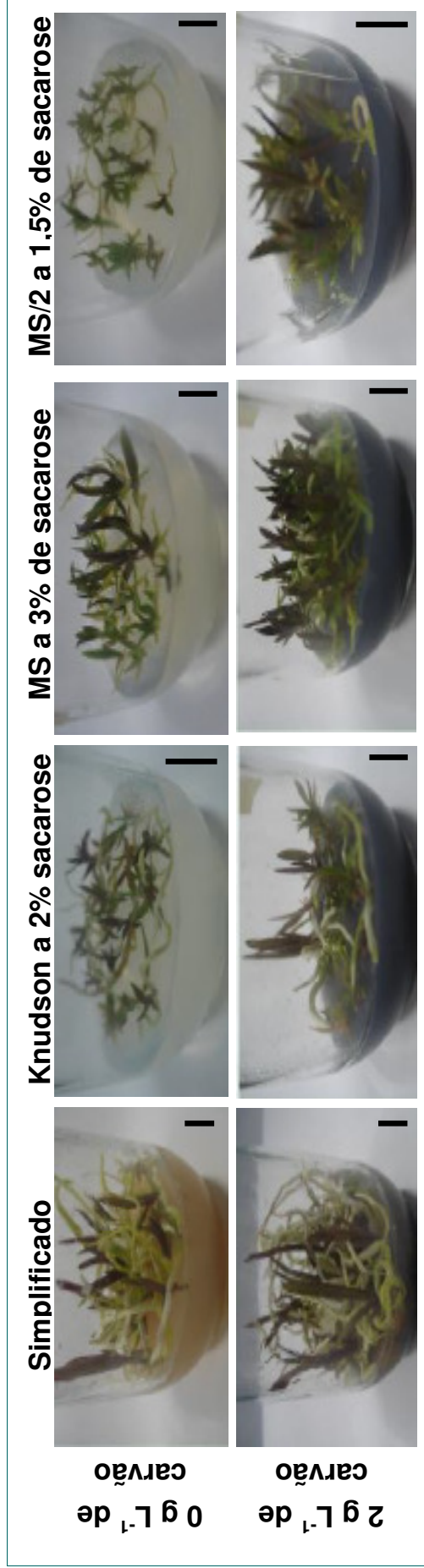
Para as variáveis MSPA e MSSR foi observada interação significativa entre meio nutritivo X carvão ativado. Quando presente no meio nutritivo, o carvão ativado favoreceu o desenvolvimento da parte aérea, com exceção do meio Knudson a 2% de sacarose (Tabela 02 e Figura 02).

O carvão ativado, quando presente no meio nutritivo, favorece o desenvolvimento *in vitro* da plântula porque evita a oxidação dos tecidos, bem como promove a adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo explante, meio nutritivo, reguladores vegetais e/ou outros compostos orgânicos (ARDITTI & ERNST, 1992; GEORGE, 1993). A utilização de carvão ativado para *Cattleya* ssp. é relatado por Faria *et al.* (2002), Galdiano Junior *et al.* (2012), Guson *et al.* (2012), assim como também para outros gêneros da família Orchidaceae (ARAUJO *et al.*, 2006; MORALES *et al.* 2006; CHARPHA *et al.*, 2009; SCHNEIDERS *et al.*, 2012; SOARES *et al.* 2012).

**Tabela 02:** Valores médios para sobrevivência (%), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca do sistema radicular (MSSR) de *Cattleya elongata*, em função de diferentes composições do meio nutritivo e de diferentes níveis de carvão ativado.

Sobrevivência (%)			
Meio nutritivo	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )		Média Geral
	0,0	2,0	
Simplificado	93 aA	92 aA	93 a
Knudson a 2% de sacarose	85 aA	92 aA	89 a
MS a 3% de sacarose	85 aB	97 aA	91 a
MS/2 a 1,5% de sacarose	91 aA	91 aA	91 a
Média Geral	89 B	93 A	-
MSPA (mg)			
Simplificado	3,41 abB	5,30 aA	4,4 ab
Knudson a 2% de sacarose	2,87 abA	2,60 bA	2,7 c
MS a 3% de sacarose	4,14 aB	7,04 aA	5,6 a
MS/2 a 1,5% de sacarose	2,26 bB	5,30 aA	3,8 ab
Média Geral	3,2 B	5,1 A	-
MSSR (mg)			
Simplificado	12,19 aB	19,46 aA	15,8 a
Knudson a 2% de sacarose	4,06 bA	3,75 cA	3,9 bc
MS a 3% de sacarose	2,26 bB	9,69 bA	6,0 b
MS/2 a 1,5% de sacarose	1,16 bA	4,22 cA	2,7 c
Média Geral	4,9 B	9,3 A	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e pela mesma letra maiúscula em cada linha, para mesma variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 02:** Plantas de *Cattleya elongata* cultivadas *in vitro* em diferentes composições de meio nutritivo, na presença ou ausência de carvão ativado. Barra: 1 cm.



Dentre os meios nutritivos testados, os melhores resultados para MSPA foram obtidos em meio simplificado (5,30 mg), em meio MS a 3% de sacarose (7,04 mg) e em meio MS/2 a 1,5% de sacarose (5,30 mg), suplementados com carvão ativado (Tabela 02).

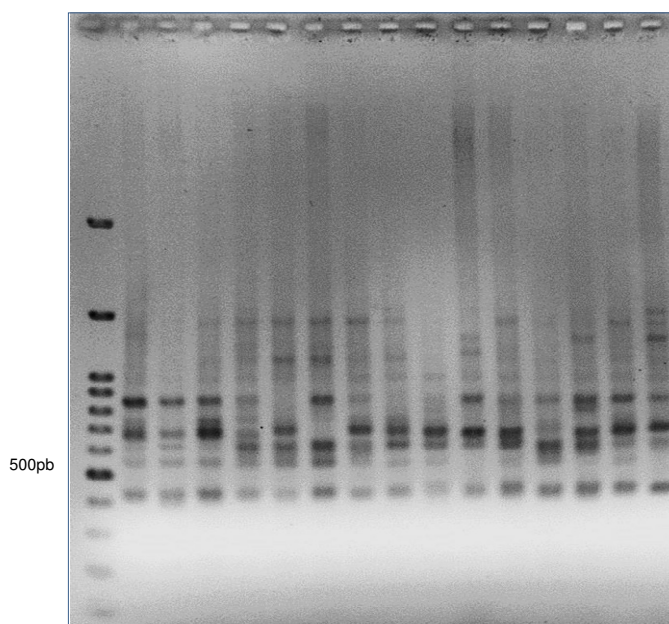
Os meios nutritivos tradicionais são compostos por macronutrientes, micronutrientes, ferro, EDTA e vitaminas. Esses componentes podem ser substituídos por produtos orgânicos e adubos comerciais, os quais são fontes de aminoácidos, vitaminas, sais minerais e reguladores vegetais na formulação dos meios nutritivos simplificados (SOUZA *et al.*, 2013). Para o crescimento *in vitro* de orquídeas, é reportada a utilização de batata, maçã, mamão, tomate, banana, água de coco e adubo NPK (ARDITTI & ERNST, 1992; REGO-OLIVEIRA & FARIA, 2005; ARAUJO *et al.*, 2006; UNEMOTO *et al.*, 2007; STANCATO *et al.*, 2008; PEDROSO DE MORAES *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2009; HERMANN *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013), sendo estes últimos três os mais corriqueiramente utilizados.

Dentre os meios nutritivos testados, o meio simplificado suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (19,46 mg) proporcionou melhor MSSR (Tabela 01). Uma possível explicação para isso é que a polpa de banana tenha promovido o espessamento e crescimento das raízes por ser fonte de potássio (ARDITTI & ERNST, 1992; SU *et al.*, 2012). Essa informação é corroborada por Araújo *et al.* (2006). Outra possível explicação é a presença de água de coco no meio simplificado. Segundo Soares *et al.* (2013), há vários hormônios presentes na água de coco, incluindo auxinas, as quais favorecem a formação de raízes. Embora a utilização do meio simplificado possa ser alvo de críticas porque a porcentagem nutricional dos componentes tende a variar, dificultando a reprodução dos resultados (ARDITTI & ERNST, 1992), o seu uso isso permite maior acessibilidade aos componentes do meio, em especial para orquidófilos que realizam o estabelecimento *in vitro* e a micropropagação de forma caseira (FARIA *et al.*, 2012).

O carvão ativado também contribuiu para o enraizamento de *C. elongata*, possivelmente por promover o escurecimento do meio, diminuindo a incidência de luz (ARDITTI & ERNEST, 1992; GEORGE, 1993). O seu uso já foi relatado por Faria *et al.* (2002), Araújo *et al.* (2006), Charpla *et al.* (2009), Guson *et al.* (2012), dentre outros, os quais obtiveram bons resultados.

### Diversidade do banco de germoplasma (BAG) *in vitro*

Os cinco *primers* utilizados produziram 73 *loci* com boa resolução (Figura 03). O número de *loci* por primer variou entre 10 e 21, com uma média de 14,6, sendo a maioria dos *loci* polimórficos. As amostras analisadas apresentaram índice de polimorfismo (P) de 74% e heterozigotidade média esperada (He) de 0,21.



**Figura 03:** Gel de agarose a 1,4% mostrando o padrão eletroforético de amostras de *Cattleya elongata* amplificadas com o primer MANNY. Aplicação 1: Marcador 100pb. Aplicações 2 – 16 amostras de *C. elongata* do BAG *in vitro* – LCTV.

A diversidade genética das plantas do BAG *in vitro* de *C. elongata* do LCTV/UFBA é representativa, visto que os índices analisados foram superiores aos relatados por Cruz *et al.* (2011) (P=56,8%; He= 0,175) em um estudo de variabilidade genética de nove populações de *C. elongata* da Chapada Diamantina – BA também utilizando marcadores ISSR.

As diferenças entre os resultados dos dois estudos são, possivelmente, decorrentes de diferenças metodológicas (utilização de *primers* distintos) e da

origem do material utilizado. No presente trabalho, foram analisadas amostras de gerações distintas (município de Mucugê) e também houve a inclusão de amostras de Campo Formoso, não incluído no estudo de Cruz *et al.* (2011).

### **Aclimatização**

Plantas de *C. elongata* apresentaram alta porcentagem de sobrevivência (75 a 93%) durante o processo de aclimatização, não diferindo significativamente entre os substratos testados (Tabela 03). Também não foi verificada diferença significativa para variável número de brotos por planta, variando de 0,28 a 0,63 (Tabela 03).

**Tabela 03:** Valores médios para sobrevivência (%), número de brotos e vigor de *Cattleya elongata*, em função de diferentes substratos.

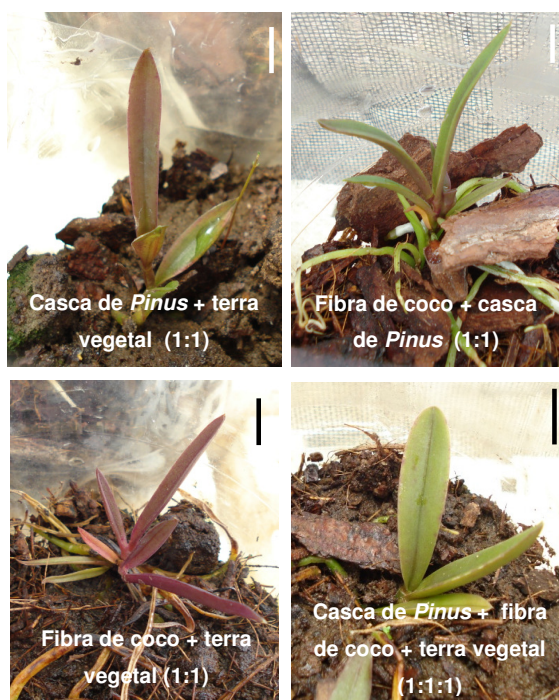
Substratos	Sobrevivência (%)	Número de brotos por planta	Vigor
Casca de <i>Pinus</i> + terra vegetal (1:1)	75 a	0,43 a	Bom
Fibra de coco + terra vegetal (1:1)	80 a	0,28 a	Ruim
Casca de <i>Pinus</i> + fibra de coco (1:1)	93 a	0,63 a	Excelente
Casca de <i>Pinus</i> + fibra de coco + terra vegetal (1:1:1)	93 a	0,58 a	Muito bom

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Durante a fase de aclimatização de orquídeas é necessária à utilização de substratos de fácil aeração, como o xaxim desfibrado e esfagno (ASSIS *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2005; LONE *et al.*, 2008). Mas, como são de origem vegetal e as espécies estão em risco de extinção, novos substratos vêm sendo testados. Vários autores relataram resultados satisfatórios para aclimatização de orquídeas em substratos ecologicamente corretos (DEMATÊ & DEMATÊ, 1996; MORAES *et al.*, 2002; ASSIS *et al.*, 2005; MULLER *et al.*, 2007; VILLA *et al.*, 2007; AVILA-DIAZ *et al.*, 2009; SORACE *et al.*, 2009; STEFANELLO *et al.*, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2009; LONG *et al.*, 2010; MATA-ROSAS *et al.*, 2010; DORNELLES & TREVILIN, 2011, HUANG & CHUNG, 2011; JUNIOR & VENTURIERI, 2011; LESAR *et al.*, 2012). Para um híbrido de *Cattleya* e para

*Cattleya intermedia*, Colombo *et al.* (2005) e Dorneles & Trevelin (2011), sugerem, respectivamente, o uso de pó de coco e *Pinus*.

Para *C. elongata*, a escolha do substrato interferiu no vigor das plantas, sendo que as cultivadas em casa de *Pinus* + fibra de coco (1:1) apresentaram melhores resultados (Tabela 02). Isso pode estar relacionado ao fato deste substrato possibilitar boa drenagem, o que permitiu o desenvolvimento de folhas mais vistosas e as raízes bem desenvolvidas (Figura 04).



**Figura 04:** Plantas de *Cattleya elongata* cultivadas em diferentes substratos. Barra: 1 cm

## CONCLUSÃO

Para promover o estabelecimento *in vitro* de *C. elongata*, cápsulas que não tenham sofrido deiscência devem ser desinfestadas e as sementes devem ser diretamente inoculadas em meio MS a 3% de sacarose ou em meio simplificado. Para promover o desenvolvimento da parte aérea, as plântulas devem ser cultivadas em meio MS/2 a 1,5% de sacarose ou em meio simplificado suplementados com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Para induzir o enraizamento é indicado o uso do meio simplificado suplementado com carvão ativado.

O BAG *in vitro* de *C. elongata* mantido no LCTV/UFBA está sendo eficiente em conservar o germoplasma da espécie.

As plantas estabelecidas *in vitro* podem ser transferidas para o ambiente *ex vitro* de forma eficiente, sendo indicado a utilização do substrato casa de *Pinus* + fibra de coco (1:1).

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G.; NUNES, V.F. 2006. Métodos de desinfestação de sementes para cultivo *in vitro* de orquídeas epífitas do Sul do Brasil. **Horticultura Brasileira**, **24**: 217-220.
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R.; ROCHA, H.S. 2006. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, **2 (2)**: 61-67.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. 1992. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons Inc. 682 p.
- ASGHAR, S.; AHMAD, T.; HAFIZ, I.A.; YASEEN, M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma White. **African Journal of Biotechnology**, **10 (16)**: 3097-3103.
- ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.; COLOMBO, L.A.; RODRIGUES PORTELA DE CARVALHO, J.F. 2005. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**, **27 (2)**: 255-260.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **99**: 335-343.
- AZEVEDO, C.O.; VAN DEN BERG, C. 2007. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, **34 (1)**: 1-47.
- BAQUE, M.A.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. 2010. Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. **Plant Cell Rep**, **29**: 685-694.
- BEKTAŞ, E.; CÜCE, M.; SÖKMEN, A. 2013. *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. **Turk J Bot** **37**: 336-342.
- BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT, L.P.; STEFANELLO, S. 2010. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento

- in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, **8 (1)**: 09-13.
- CHAPLA, P.I.; BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; SILVA, J.M.; ROCHA, A.C.S.; STEFANELLO, S. 2009. pH, carvão ativado e agentes gelificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, **5 (2)**: 87-93.
- COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; FONSECA, C.B. 2005. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, **27 (1)**: 145-150.
- COLOMBO, R.C.; FAVETTA, V.; FARIA, R.T. 2012. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, **59 (6)**: 873-876.
- CRUZ, D.T.C.; BORBA, E.D.; VAN DEN BERG, C. 2003. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus: série Ciências Agrárias**, **3 (1, 2)**: 26-34.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **294**: 87-98.
- DEMATÊ, J. B. I.; DEMATÊ, M. E. S. P. 1996. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **31 (11)**: 803-813.
- DIETRICH, S.M.C. 1986. Inibidores de crescimento. *In*: FERRI, M.G. (Org.). **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU/EDUSP. pp 193-212.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochem Bull**, **19**:11-15.
- DORNELES, L.T.; TREVELIN, V. 2011. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **IHERINGIA**, **66 (2)**: 167-174.
- DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **96**: 235-243.

- ENGELMANN, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germoplasma – a review. **Euphytica**, **57**: 227-243.
- ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. 2000. Current development of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. **Cahiers Agricultures**, 9: 237-245.
- ENGELMANN, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, **40**: 427-433.
- FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; BRIGATTO, U. 2002. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, **2 (3)**: 489-492.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. 2012. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenasa. 116p.
- FERREIRA, D.F. 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, **6 (2)**: 36-41.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K.F.L.; LEMOS, E.G.M. 2012. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, **42 (5)**: 801-807.
- GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. England: Exegetics Limited. 554 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 183-260.
- GUSON, R.R.; MORAES, C.P.; RONCONI, C.C. 2012. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* HOOK. **Revista de Agronegócios e Meio Ambiente**, **5 (3)**: 551-563.
- HERRMANN, M.H.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. 2011. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas em meio de cultura alternativo. **Revista Brasileira de Agrociência**, **17 (1, 4)**: 162-166.
- HOSSAIN, M.M.; KANT, R.; VAN, P.T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A. 2013. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **32 (2)**: 69-139.



- HUANG, C.; CHUNG, J. 2011. Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **106**: 31-38.
- JUNIOR, D.S.; VENTURIERI, G.A. 2011. Ex vitro acclimatization of *Cattleya forbesii* and *Laelia purpurata* seedlings in a selection of substrates. **Acta Scientiarum. Agronomy**, **33 (1)**: 97-103.
- KISHOR, R.; DEVI, H.S. 2009. Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f 3 *Vanda stangeana* Reichb.f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **97**: 121-129.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, **14**: 214-217.
- LESAR, H.; HLEBEC, B.; CERANIC, N.; KASTELEC, D.; LUTHAR, Z. 2012. Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under in vitro conditions. **Acta Agriculturae Slovenica**, **99 (1)**: 69-75.
- LONE, A.B.; BARBOSA, C.M.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T. 2008. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, **30 (4)**: 465-469.
- LONG, B.; NIEMIERA, A.X.; CHENG, Z.; LONG, C. 2010. In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **101**: 151-162.
- LU, J.J.; ZHA, H.Y.; SUO, N.N.; WANG, S.; SHEN, B.; WANG, H.Z.; LIU, J.J. 2012. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, **137**: 1-10.
- MAHENDRAN, G.; MUNIAPPAN, V.; ASHWINI, M.; MUTHUKUMAR, T.; NARMATHA BAI, V. 2013. Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. **Acta Physiologiae Plantarum**, **35 (3)**: 829-840.
- MATA-ROSA, M.; BALTAZAR-GARCÍA, R.J.; MOON, P.; HIETZ, P.; LUNA-MONTERROJO, V.E. 2010. In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. **Plant Biotechnol Rep**, **4**: 157-163.

- MILANEZE, M. A. 1997. Estudos em orquídeas nativas do Brasil: Morfologia de sementes e cultivo assimbiótico. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, São Paulo. 241 p.
- MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. 2002. Substratos para aclimatização de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, **24 (5)**: 1397-1400.
- MORALES, S.; MILANEZE, M.A.G.; MACHADO, M.F.P.S. 2006. Effect of activated charcoal for seedlings development of *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Journal of Plant Sciences**, **1 (4)**: 388-391.
- MULLER, T.S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A.R.; STEFANELLO, S. 2007. Crescimento *in vitro* e aclimatação de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, **5 (2)**: 252-254.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497.
- PAUDEL, M.R.; PANT, B. 2012. In vitro plant regeneration of *Esmeralda clarkei* Rchb.f. via protocorm explant. **African Journal of Biotechnology**, **11 (54)**: 11704-11708.
- PEREIRA, C.E.; OLIVIERA, D.F.; KIKUT, A.L.P. 2002. Determinação de inibidores da germinação do endosperma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, **24 (1)**: 306-311.
- PEDROSO DE MORAES, C.; SANTOS, N.S.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; LEAL, T.S. 2009. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, **13 (2)**: 57-65.
- PINHEIRO, L.R.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S.; PEREIRA, K.L.G.; DINIZ, L.E.C. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, **298**: 1815-1825.
- RAO, N. K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, **3 (2)**: 136-145.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, **128**: 9-17.

- REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.F. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum Agronomy**, **27 (1)**: 1-5.
- SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía Mesoamericana**, **21(1)**: 193-205.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M.R.; SUZUKI, R.M. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, **59 (2)**: 185-191.
- SHEN, J.; DING, X.; LIU, D.; DING, G.; HE, J.; LI, X.; TANG, F.; CHU, B. 2006. Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, **29 (3)**: 420-422.
- SMITH, J.L.; HUNTER, K.L.; HUNTER, R.B. 2002. Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. **Southeastern Naturalist**, **1 (1)**: 17-26.
- SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; MACEDO, M.C.; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; ROSA, C.B.C.J. 2012. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra**, **24 (3)**: 226-233.
- SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SUZUKI, R.M.; SCALON, S.P.Q.; ROSA JUNIOR, E.J. 2013. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, **31 (1)**: 63-67.
- SORACE, M.; FARIA, R.T.; JÚNIOR, C.V.D.; GOMES, G.P.; BARBOSA, C.M.; VIEIRA, F.G.N.; SILVA, G.L.; TAKAHASHI, L.S.A.; SCHNITZER, J.A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, **29 (4)**: 775-782.
- SORACE, M.; FARIA, R.F.; FONSECA, I.C.B.; YAMAMOTO, L.Y.; SORACE, M.A.F. 2009. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia* X *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, **30 (4)**: 771-778.
- SOUZA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISSAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. 2007. Contaminação Microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, **5 (1)**: 405-407.

- SOUZA, R.L.B.; LONE, A.B.; FARIA, R.T.; OLIVEIRA, K.S. 2013. Pulp fruit added to culture medium for *in vitro* orchid development polpa de frutos adicionada ao meio de cultivo no crescimento *in vitro* de orquídea. **Semina: Ciências Agrárias**, **34 (3)**: 1141-1146.
- STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, **67 (1)**: 51-57.
- STEFANELLO, S.; SILVEIRA, E.V.; OLIVEIRA, L.K.; BESSON, J.C.F; DUTRA, G.M.N. 2009. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* LINDL. propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, **2 (3)**: 467-476.
- SU, M.J.; SCHNITZER, J.A.; FARIA, R.T. 2012. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, **4 (1)**: 28-34.
- SUZUKI, R.M.; ALMEIDA, V.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, **37**: 731-742.
- SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, **104**: 543-556.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. 1998. Meios nutritivos. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 1-20.
- TOSCANO-DE-BRITO, A.; CRIBB, J.C. 2005. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. São Paulo: Nova Fronteira. 400 p.
- UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. 2007. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, **13 (2)**: 267-269.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. 1949. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, **110**: 605-617.
- VERMA, P.C.; CHAKRABARTY, D.; JENA, S.N.; MISHRA, D.K.; SINGH, P.K.; SAWANT, S.V.; TULI, R. 2009. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: comparative results for RAPD and ISSR. **Industrial Crops and Products**, **2 (9)**: 581-589.
- VIEIRA, J.G.J; UNEMOTO, L.K.; YAMAKAMI, J.K; NAGASHIMA, G.T.; FARIA, R.T; AGUIAR, R.S. 2009. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de

- Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, **37 (1)**: 48-52.
- VILLA, F.; PEREIRA, A.R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G. 2007. Influência de substratos alternativos na aclimatização de orquídeas. **Revista Ceres**, **54 (316)**: 501-505.
- WANG, H.Z.; FENG, S.G.; LU, J.J.; SHI, N.N.; LIU, J.J. 2009 a. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, **122**: 440-447.
- WANG, H.Z.; WU, Z.X.; LU, J.J.; SHI, N.N.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.T.; LIU, J.J. 2009 b. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genética**, **136**: 391-399.
- WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T.. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. pp. 87-132.
- WOLFE, A.D.; XIANG, Q.Y.; KEPHANT, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural population of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) band. **Molecular Ecology**. **7**: 1107-1125.
- YAMAMOTO, L.Y.; SORACE, M.; FARIA, R.T.; TAKAHASHI, L.S.; SCHNITZER, J.A. 2009. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido primário *Miltonia regnellii* Rchb. f. X *Oncidium concolor* Hook. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, **30 (1)**: 1035-1042.
- YAO, X.; GAO, L.; YANG, B. 2007. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. **Frontiers of Biology**, **2 (4)**: 419-424.

## CAPÍTULO 02

Multiplicação *in vitro* de *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae Juss.), visando o emprego de metodologias de baixo custo

## RESUMO

*Cattleya elongata* é uma orquídea endêmica da Chapada Diamantina – BA e apresenta elevado potencial ornamental. No entanto, muitos dos exemplares comercializados são oriundos do extrativismo e isso vem contribuindo para redução das populações naturais. A micropropagação é uma alternativa para abastecer o mercado ornamental de forma sustentável, pois permite realizar a multiplicação em larga escala, em curto intervalo de tempo e utilizando espaço físico reduzido. O objetivo do presente trabalho foi realizar a multiplicação de *C. elongata*, bem como testar metodologias que permitam reduzir o custo de produção. Para tanto, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foi testada a influência de diferentes tipos de explantes e reguladores vegetais. Foram analisados os parâmetros sobrevivência (%), explantes que formaram brotos (%), número de brotos por explante, matéria seca da parte aérea (mg), do sistema radicular (mg) e do calo (mg). Após estabelecido o melhor explante (plântula com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, seccionada na porção superior) e constatada a não necessidade do uso de regulador vegetal foi montado o segundo experimento. Neste, foi testada a influência do meio nutritivo em estado líquido sob diferentes regimes de agitação e suporte, sendo avaliados os mesmos parâmetros descritos acima. Plântula com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, seccionada na porção superior é o explante indicado para multiplicação de *C. elongata*. Quando utilizado este tipo de explante não é necessário o uso de meio nutritivo suplementado com regulador vegetal para induzir a brotação. Em contrapartida, o melhor desenvolvimento da parte aérea foi observado em culturas mantidas em meio suplementado com alta concentração de ANA (10,740  $\mu$ M). É dispensável o uso de BAP. É possível realizar a multiplicação em meio nutritivo em estado líquido com ponte de algodão ou suporte de papel.

**PALAVRAS-CHAVE:** Orquídeas; multiplicação *in vitro*; ANA; BAP; meio nutritivo líquido.

## ABSTRACT

*Cattleya elongata* is an endemic orchid of Chapada Diamantina – BA and has a high ornamental potential. However, many of the exemplars marketed come from predatory collection and this has contributed for the reduction of natural populations. Micropropagation is an alternative way to achieve sustainability for the ornamental plants market, as it allows large-scale multiplication in a short time interval and using reduced physical space. The objective of this study was to achieve the multiplication of *C. elongata*, as well as test methodologies to reduce the cost of production. For this purpose, two experiments were carried out. In the first experiment we tested the influence of different types of explants and concentrations of plant growth regulators. The following parameters were analyzed: survival (%), explants that had formed shoots (%), number of shoots per explants, dry mass of the aerial part (mg), root system (mg) and callus (mg). After the best explant was established (seedling with 0,3 cm long sectioned on the upper portion) and decided it is not necessary to use plant growth regulators the second experiment was mounted. In this experiment was tested the influence of liquid nutrient medium under different schemes of agitation and support, being evaluated the same variables described above. Seedlings with 0,3 cm long sectioned on the upper portion is the explant indicated for multiplication of the *C. elongata*. When this type of explant is used it is not necessary to use nutrient medium supplemented with growth regulator to induce sprouting. By contrast, the best development of aerial part and root system was observed in cultures maintained in medium supplemented with high concentrations of ANA (10.740  $\mu\text{M}$ ). The use of BAP is dispensable. It is possible to perform the multiplication in liquid nutrient medium with a bridge of cotton or paper support.

Keywords: Orchids; in vitro multiplication; ANA; BAP; liquid medium.



## INTRODUÇÃO

*Cattleya elongata* Barb. Rodr. é uma espécie de ocorrência restrita à região da Chapada Diamantina – BA (CRUZ *et al.*, 2003) e caracteriza-se por apresentar flores grandes com coloração vermelha amarronzada e labelo magenta (AZEVEDO & VAN DEN BERG, 2007). Em decorrência do seu potencial ornamental, muitos exemplares são coletados de forma extrativista na natureza, o que vem contribuindo para redução do tamanho de muitas populações (CRUZ *et al.*, 2011).

A cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta para abastecer o mercado ornamental de forma sustentável. Através da técnica de micropropagação é possível realizar a multiplicação das plantas, em espaço físico reduzido e em curto intervalo de tempo (GEORGE, 1993). A literatura disponível a cerca da multiplicação de orquídeas é extensa e há muitas variações entre os protocolos estabelecidos (CHERUVATHUR *et al.*, 2010; LONG *et al.*, 2010; MATA-ROSAS *et al.*, 2010; MAYER *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2010; VYAS *et al.*, 2010; HUANG & CHUNG, 2011; LI *et al.*, 2011; MENGXI *et al.*, 2011; NG & SALEH, 2011; TAN *et al.*, 2011; VASUDEVAN & STADEN, 2011; DEB & PONGENER, 2012; PANWAR *et al.*, 2012; PRIZÃO *et al.*, 2012; HOSSAIN *et al.*, 2013). De forma geral, são utilizados explantes que apresentam células totipotentes, pois estas têm todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta inteira. No entanto, não há relatos na literatura relacionados à multiplicação *in vitro* *C. elongata*.

Quando o objetivo é realizar a multiplicação de plantas, o meio nutritivo, além de dispor das substâncias essenciais ao desenvolvimento dos tecidos e órgãos, tende a ser suplementado com reguladores vegetais. Segundo Mata-Rosas (2010), a utilização de citocininas sozinhas ou em associação com auxinas é bem relatada na multiplicação de orquídeas, no entanto, a presença de reguladores vegetais pode induzir a variação somaclonal (ARDITTI & ERNST, 1992) e estão entre as substâncias de maior custo utilizadas na cultura de tecidos vegetais.

Uma alternativa para reduzir os custos de produção é utilizar explantes capazes de sintetizar seus próprios hormônios, bem como substituir o uso de ágar por agentes gelificantes alternativos ou realizar o uso de meio nutritivo em estado

líquido. Faria *et al.* (2006), Fialho *et al.* (2011), Galdino-Junior *et al.* (2012) e Samarfard *et al.* (2013) já realizaram o cultivo *in vitro* de orquídeas sem o uso de ágar e consideram o emprego desta metodologia eficiente.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a multiplicação de *C. elongata*, bem como testar metodologias que permitam reduzir o custo de produção de mudas dessa espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Influência do tipo de explante e dos reguladores vegetais na multiplicação**

Foram utilizados três tipos de explantes, sendo eles: a) planta *in vitro* com aproximadamente 1 cm de comprimento da parte aérea (E1); b) plântula *in vitro* com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, seccionada na porção superior (E2) e c) plântula *in vitro* com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, a qual teve suas folhas retiradas com auxílio de pinça (E3). Os explantes foram inoculados em meio nutritivo Murashige & Skoog (1962) com metade das concentrações salinas (MS/2) a 1,5% de sacarose, suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e diferentes concentrações dos reguladores vegetais, 0,00 µM; 0,537 µM ou 10,740 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,00 µM; 4,44 µM ou 8,880 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O meio nutritivo foi gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> ágar, o pH foi ajustado para 5.7 ± 1 e a esterilização ocorreu em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 X 3 X 3 (tipos de explantes X concentrações de ANA X concentrações de BAP) e contendo cinco repetições com dez amostras cada. Após duzentos e dez dias foram avaliados os parâmetros sobrevivência (%), matéria seca da parte aérea (mg), matéria seca do sistema radicular (mg), matéria seca do calo (mg), explantes que formaram brotos (%) e número brotos por explante.

### **Influência do meio nutritivo em estado líquido na multiplicação, sob diferentes regimes de agitação e suporte**

Plântulas *in vitro* com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, cortadas na porção superior, foram inoculadas em meio nutritivo MS/2 a 1,5% de sacarose, suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. No tratamento controle, o meio foi gelificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os demais tratamentos consistiram em meio líquido a) sob agitação; b) sem agitação; c) sem agitação, com suporte de algodão; d) sem agitação, com suporte de espuma e e) sem agitação, com ponte de papel filtro. O meio nutritivo teve o pH ajustado para 5.7 ± 1 e a esterilização ocorreu em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

O delineamento foi inteiramente casualizado, contendo seis repetições de oito amostras cada. Após cento e cinquenta dias foram avaliados os parâmetros

sobrevivência (%), explantes que formaram brotos (%), número de brotos por explantes, matéria seca da parte aérea (mg), do sistema radicular (mg) e do calo (mg).

### ***Condições de cultivo***

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia e mantidos sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , luz fluorescente ( $60\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo de 16 horas/luz.

### ***Análise estatística***

Para os dois experimentos foram realizadas a análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (primeiro experimento) ou teste de Tukey (segundo experimento) a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Influência do tipo de explante e dos reguladores vegetais na multiplicação

Para sobrevivência (%) *in vitro* de *C. elongata* não houve interação entre os diferentes fatores testados. Dentre os tipos de explantes, o E1 proporcionou melhor sobrevivência (100%). As concentrações dos diferentes reguladores vegetais não influenciaram neste parâmetro (Tabelas 01).

**Tabela 01:** Valores médios para sobrevivência, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de *Cattleya elongata*, em função dos tipos de explantes e das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).

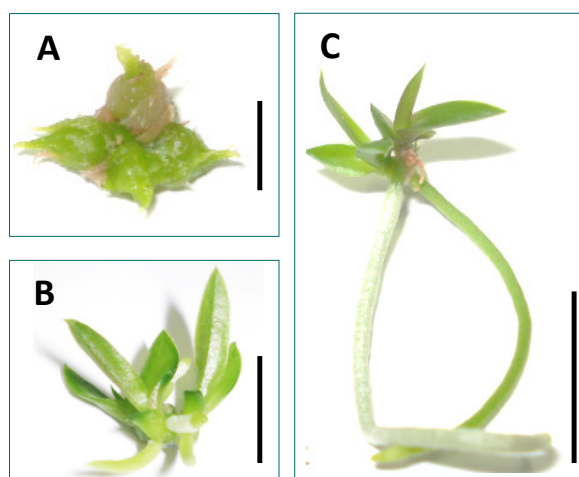
	Tipos de Explantes			Concentrações de ANA ( $\mu\text{M}$ )			Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )		
	E1	E2	E3	0,000	0,537	10,740	0,00	4,44	8,88
Sobrevivência (%)	100,0A	95,1B	96,0B	96,0A	98,2A	96,9A	98,7A	96,0A	96,4A
Matéria seca da parte aérea (mg)	24,6B	41,4A	32,0B	21,5C	32,7B	43,9A	37,5A	24,8B	35,8A
Matéria seca do sistema radicular (mg)	25,33A	20,70A	28,32A	16,8B	22,4B	35,1A	25,49A	19,27B	29,59A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada linha, para mesma condição de cultivo, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para o parâmetro matéria seca da parte aérea não houve interação entre os diferentes fatores. Dentre os explantes testados, E2 promoveu melhor resultado (41,4 mg) (Tabela 01). Em relação às diferentes concentrações de ANA, maior acúmulo de matéria seca da parte aérea foi verificada em culturas mantidas em meio nutritivo suplementado com 10,740  $\mu\text{M}$  de ANA (43,9 mg) (Tabela 02). Entre as diferentes concentrações de BAP testadas, melhores resultados foram observados em cultura mantidas em meio nutritivo sem regulador vegetal (37,5 mg) ou suplementado com 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP (35,8 mg) (Tabela 01).

As auxinas e/ou as citocininas quando adicionadas ao meio nutritivo podem auxiliar no crescimento *in vitro*. Souto *et al.* (2010) verificaram que quando o cultivo de *Cattleya bicolor* era realizado em meio nutritivo suplementado com ANA havia maior acúmulo de matéria seca da parte aérea em comparação ao tratamento controle. Araújo *et al.* (2006) analisaram a influência de diferentes

concentrações de BAP na multiplicação de *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' e observaram que na maior concentração de BAP testada (17,76  $\mu\text{M}$ ) houve melhor resultado para acúmulo de matéria seca da parte aérea. No entanto, para *C. elongata* o uso de BAP é dispensável. Provavelmente essa espécie é capaz de sintetizar níveis de hormônio que permitem a divisão celular e alongamento da parte aérea (Figura 01 A; B).



**Figura 01:** Morfogênese *in vitro* de *Cattleya elongata*. A. Formação de brotos; B. Desenvolvimento da parte aérea; C. Desenvolvimento do sistema radicular. Barra: 1 cm

Para o parâmetro matéria seca do sistema radicular não houve interação entre os diferentes fatores. Embora os tipos de explantes não tenham influenciado no crescimento das raízes (Figura 01 C), diferenças significativas foram observadas entre as concentrações dos reguladores vegetais ANA e BAP (Tabela 01).

Em relação as diferentes concentrações de ANA, maior matéria seca do sistema radicular foi verificada em culturas mantidas em meio nutritivo suplementado com 10,740  $\mu\text{M}$  de ANA (35,1 mg) (Tabela 01). O ANA é um tipo de auxina sintética bastante utilizada na cultura de tecidos vegetais para induzir a formação de raízes (ARDITTI & ERNST, 1992; GEORGE, 1993). Souto *et al.*

(2010) analisaram a influência de diferentes concentrações de ANA no enraizamento *in vitro* de *Cattleya bicolor*. O uso de meio nutritivo suplementado 2,685 µM de ANA favoreceu o crescimento do sistema radicular. A utilização de meio nutritivo suplementado com ANA também contribuiu na formação de raízes em *Laelia speciosa* (AVILA-DIAZ *et al.*, 2009), No entanto, Cheruvathur *et al.* (2010) constataram que não era necessário o uso de ANA para induzir o enraizamento *in vitro* de *Malaxis acuminata*.

Em relação às diferentes concentrações de BAP, melhores resultados foram obtidos na ausência deste regulador (25,49 mg) ou em meio suplementado com 8,88 µM de BAP (29,59 mg) (Tabela 01).

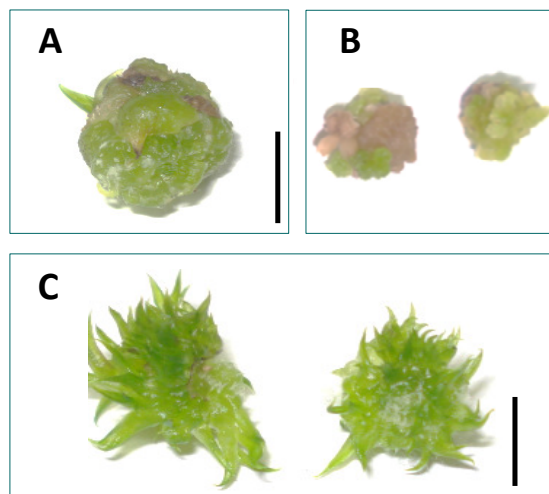
Para o parâmetro matéria seca do calo houve interação significativa entre os tipos de explante, as concentrações de ANA e as concentrações de BAP, sendo constatado maior índice em culturas utilizando E2 cultivados em meio nutritivo suplementado com 10,740 µM de ANA, associado a 4,44 µM de BAP (73,3 mg) (Tabela 02).

**Tabela 02:** Valores médios para explantes que formaram brotos (%) e matéria seca do calo de *Cattleya elongata*, em função da interação entre os tipos de explantes, concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).

Tipos de Explantes	Concentrações de ANA (µM)	Matéria seca do calo (mg)			Explantes que formaram brotos (%)		
		Concentrações de BAP (µM)			Concentrações de BAP (µM)		
		0,00	4,44	8,88	0,00	4,44	8,88
E1	0,000	0,0aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>
	0,537	0,0aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>
	10,740	0,0aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>B</sup>	0,0aA <sup>B</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>
E2	0,000	19,1aA <sup>A</sup>	6,3bA <sup>A</sup>	3,9aA <sup>A</sup>	100,0aA <sup>A</sup>	92,0aA <sup>A</sup>	84,0aA <sup>B</sup>
	0,537	15,6aA <sup>A</sup>	4,2bA <sup>A</sup>	17,2aA <sup>A</sup>	96,0aA <sup>A</sup>	67,0bB <sup>B</sup>	98,0aA <sup>A</sup>
	10,740	12,1aB <sup>A</sup>	73,3aA <sup>A</sup>	25,2aB <sup>A</sup>	98,0aA <sup>A</sup>	90,0aA <sup>A</sup>	87,0a <sup>A</sup>
E3	0,000	0,7aA <sup>A</sup>	0,0aA <sup>A</sup>	0,3aA <sup>A</sup>	80,0bA <sup>B</sup>	84,0aA <sup>A</sup>	82,3aA <sup>B</sup>
	0,537	10,7aA <sup>A</sup>	1,4aA <sup>A</sup>	7,2aA <sup>A</sup>	94,0aA <sup>A</sup>	96,0aA <sup>A</sup>	90,0aA <sup>A</sup>
	10,740	8,5aA <sup>A</sup>	3,7aA <sup>B</sup>	5,5aA <sup>B</sup>	95,0aA <sup>A</sup>	92,0aA <sup>A</sup>	92,0aA <sup>A</sup>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, para o mesmo tipo de explante, pela mesma letra maiúscula em cada linha e pela mesma letra sobrescrita, sob a mesma condição de cultivo, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

No presente trabalho foi observada a presença de calos friáveis e não friáveis (Figura 02). Esta estrutura pode ser muito importante para alguns procedimentos da cultura de tecidos vegetais (George, 1993), no entanto, quando o objetivo é obter brotos que apresentem fidelidade genética em relação à planta mãe, não é satisfatório uma morfogênese precedida pela formação de calo. Como ocorre um processo de desdiferenciação, a probabilidade de ocorrência de alterações genéticas é maior.



**Figura 02:** Morfogênese *in vitro* de *Cattleya elongata* precedida pela formação de calo. A. Calo não friável; B. Calo friável; C. Formação de brotos a partir do calo. Barra: 1 cm

Para o parâmetro explantes que formaram brotos (%), houve interação significativa entre os tipos de explantes, as concentrações de ANA e as concentrações de BAP. Diferenças significativas foram observadas entre os diferentes explantes, quando cultivados na ausência de regulador vegetal, sendo os melhores resultados obtidos para E1 (100%) e E2 (100%). Diferenças significativas também foram observadas entre os explantes, quando o cultivo ocorreu em meio nutritivo suplementado com 0,537  $\mu$ LM de ANA associado a 4,44  $\mu$ M de BAP ou em meio suplementado com 8,88  $\mu$ M de BAP. No primeiro caso, os melhores resultados foram obtidos para E1 (100%) e E3 (96%) e, no segundo



caso, o melhor resultado foi obtido para E1 (100%). Entre os demais tratamentos não houve diferenças significativas (Tabela 02).

Para o parâmetro número de brotos por explantes, o ANA não interagiu significativamente com os demais fatores e, dentre as diferentes concentrações de ANA testadas, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 03). No entanto, houve interação significativa entre os tipos de explantes e as concentrações de BAP. Maior número de brotos por explantes foi observado em E2. Vale ressaltar que quando se utiliza este tipo de explante não há necessidade do meio nutritivo ser suplementado com BAP, visto que o melhor resultado (7,6) para esta variável foi obtida na ausência deste regulador vegetal (Tabela 04; Figura 01 A).

**Tabela 03:** Valores médios para número de brotos por explantes em função das diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA).

Concentrações de ANA ( $\mu\text{M}$ )	Número de brotos por explantes
0,000	2,69 a
0,537	3,21 a
10,740	2,73 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

**Tabela 04:** Valores médios para número de brotos por explantes de *Cattleya elongata*, em função dos tipos de explantes e concentrações de BAP.

Tipos de Explante	Número de brotos por explantes		
	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )		
	0,00	4,44	8,88
E1	1,0 cA	1,0 aA	1,1 bA
E2	7,6 aA	2,9 aB	4,5 aB
E3	3,0 bA	1,9 aA	2,8 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e pela mesma letra maiúscula em cada linha, para mesma variável, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

De forma geral, na multiplicação de orquídeas é sugerida a utilização de meio nutritivo suplementado com diferentes classes de reguladores vegetais. Kerbauy (1993) constatou que ápices radiculares de *Oncidium varicosum* cultivados em meio nutritivo suplementado com 5,37  $\mu\text{M}$  ou 10,74  $\mu\text{M}$  de ANA associado a 0,222  $\mu\text{M}$  de BAP promovia maior formação de protocormóides. Para *Cattleya walkeriana*, Krapiec *et al.* (2003) observaram maior número de brotos com folhas desenvolvidas para cultivos em meio nutritivo suplementado com BAP e IBA (ácido indolbutírico). Stefanello *et al.* (2009) verificaram melhores resultados quanto a formação de protocormóides a partir de ápices radiculares e segmentos foliares de *Miltonia flavescens* cultivados em meio nutritivo suplementado com BAP, associado a 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético).

Porém, Vasudevan & Staden (2011) constataram que é possível realizar a multiplicação de *Ansellia africa* sem uso de regulador vegetal, desde que seja utilizado o protocormo como fonte de explante. Resultado semelhante foi verificado por Araújo *et al.* (2006). Estes autores constataram que não é necessário o uso de meio nutritivo suplementado com BAP para induzir a formação de brotos do híbrido *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow'. Dados estes que corroboram com o presente trabalho.

A não utilização de reguladores vegetais durante a multiplicação *in vitro* minimiza as chances de variação somaclonal, bem como reduz os custos de produção, o que favorece o mercado ornamental.

### **Influência do meio nutritivo em estado líquido na multiplicação *in vitro*, sob diferentes regimes de agitação e suporte,**

A utilização de meio nutritivo em estado líquido não interferiu na sobrevivência dos explantes em relação ao tratamento controle (93%), desde que mantido em meio sem agitação na ausência de suporte (85%), com suporte de algodão (84%) ou ponte de papel (74%) (Tabela 05).

Para os parâmetros explantes que formaram brotos (%) e número de brotos por explantes, não houve diferenças significativas entre o tratamento controle e os tratamentos que apresentavam meio líquido com suporte de espuma, algodão ou ponte de papel. Para os demais parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre o controle e demais tratamentos (Tabela 05).

**Tabela 05:** Valores médios para sobrevivência, explantes que formaram brotos, número de brotos por explantes, matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e do calo de *Cattleya elongata*, em função de diferentes condições de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Explantes que formaram brotos (%)	Número de brotos por explantes	Matéria seca da parte aérea (mg)	Matéria seca do sistema radicular (mg)	Matéria seca do calo (mg)
Meio semi-sólido (Controle)	93 a	97,6 a	6,9 a	1,36 a	0,48 a	7,28 ab
Meio líquido sob agitação	60 c	0,0 b	0,06 b	0,00 a	0,00 a	4,89 b
Meio líquido sem agitação	85 ab	8,3 b	0,17 b	0,08 a	0,00 a	5,25 b
Meio líquido sem agitação, com suporte de espuma	65 bc	73,3 a	2,46 ab	1,67 a	0,86 a	19,36 ab
Meio líquido sem agitação, com suporte de algodão	84 ab	81,0 a	4,31 ab	3,89 a	1,45 a	20,44 a
Meio líquido sem agitação, com ponte de papel	74 abc	92,5 a	5,42 a	1,76 a	0,78 a	17,70 ab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram os já citados por outros autores, os quais afirmam que é possível realizar a multiplicação de orquídeas em meio nutritivo em estado líquido. A utilização de meio nutritivo neste estado físico

reduz os custos de produção, bem como possibilita maior agilidade durante o preparo e melhor absorção dos nutrientes pelo explante. Samarfard *et al.* (2013) promoveram a multiplicação de *Phalaenopsis gigantea* em meio líquido e constataram maior formação de protocormóides em meio nutritivo suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de quitosana (polímero derivado da quitina). Faria *et al.* (2006) avaliaram a influência do meio nutritivo em estado líquido, com diferentes tipos de suporte e observaram que a espuma picada é um suporte eficiente para plantas de *Oncidium baueri* mantidas *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Galdiano Junior *et al.* (2012) para *Cattleya loddigesii*.

Estudos a cerca da substituição do ágar no cultivo de orquídeas também são relatados por Fialho *et al.* (2011) e Aggarwal & Nirmala (2012), sendo sugerida a utilização de vermiculita e fibra de coco, respectivamente.

## CONCLUSÃO

É indicada a utilização do tipo de explante E2 para realizar a multiplicação em larga escala de *Catteya elongata*. Quando utilizado este tipo de explante não é necessário o uso de meio nutritivo suplementado com regulador vegetal para induzir a brotação. Em contrapartida, o melhor crescimento da parte aérea foi observado em culturas mantidas em meio suplementado com alta concentração de ANA (10,740  $\mu\text{M}$ ). É dispensável o uso de BAP.

Não é indicado realizar o cultivo de E2 em meio nutritivo suplementado com 10,740  $\mu\text{L}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{L}$  de BAP, pois a adição desses reguladores promove muita formação de calos.

Como metodologia alternativa ao uso do ágar, bons resultados são obtidos para cultivo em meio líquido sem agitação com suporte de algodão ou ponte de papel.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; NIRMALA, C. 2012. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for in vitro orchid seed germination. **Scientia Horticulturae**, **133**: 89-92.
- ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; SILVA, A.B.; VILLA, F.; ROCHA, H.S.; COSTA, F.C. 2006. Propagação in vitro de plântulas de orquídeas em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, **2 (2)**: 68-73.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **99**: 335-343.
- AZEVEDO, C.O.; VAN DEN BERG, C. 2007. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, **34 (1)**: 1-47.
- CHERUVATHUR, M.K.; ABRAHAM, J.; MANI, B.; THOMAS, T.D. 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explantes of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **101**: 163-170.
- CRUZ, D.T.C.; BORBA, E.D.; VAN DEN BERG, C. 2003. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus: série Ciências Agrárias**, **3 (1, 2)**: 26-34.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **294**: 87-98.
- DEB, C.R.; PONGENER, A. 2012. Studies on the in vitro regenerative competence of aerial roots of two horticultural important *Cymbidium* species. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, **21(2)**: 235-241.
- FARIA, R.T.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO, L.K.; SILVA, G.L. 2006. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum Agronomy**, **28 (1)**: 71-74.

- FERREIRA, D.F. 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium, 6 (2):** 36-41.
- FIALHO, G.S.; VALE, J.C.; SOBREIRA, F.M.; SCHMILDT, E.R. 2011. Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. **IDESIA, 29 (1):** 103-105.
- GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E.G.M. 2012. Seleção de agentes alternativos ao ágar para propagação de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 07:** 756-760.
- GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. England: Exegetics Limited. 554 p.
- GOW, W.P.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. 2010. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. **Acta Physiologiae Plantarum, 32:** 621-627.
- HOSSAIN, M.M.; KANT, R.; VAN, P.T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A. 2013. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences, 32 (2):** 69-139.
- HUANG, C.; CHUNG, J. 2011. Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 106:** 31-38.
- KERBAUY, G. B. 1993. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*: efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica, 16 (1):** 1-8.
- KRAPIEC, P.V.; MILANEZE, M.A.; MACHADO, M.F.P. 2003. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences, 25 (1):** 179-182.
- LIN, Y.; LI, J.; LI, B.; HE, T.; CHUN, Z. 2010. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 105:** 329-335.
- LONG, B.; NIEMIARA, A.X.; CHENG, Z.; LONG, C. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult, 101:** 151-162.

- MATA-ROSA, M.; BALTAZAR-GARCÍA, R.J.; MOON, P.; HIETZ, P.; LUNA-MONTERROJO, V.E. 2010. In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. **Plant Biotechnol Rep, 4**: 157-163.
- MAYER, J.L.S.; STANCATO, G.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2010. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult, 103**: 411-416.
- MENGXI, L.; ZHIGANG, X.; YANG, Y.; YIJIE, F. 2011. Effects of diferente spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 106**: 1-10.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum, 15**: 473-497.
- NG, C.Y.; SALEH, N.M.; ZAMAN, F.Q. 2010. In vitro multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology, 9 (14)**: 2062-2068.
- NG, C.; SALEH, N. M. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. **Plant Cell Tiss Organ Cult, 105**: 193-202.
- Panwar, D.; Ram, K.; Shekhawat, N.S.S. 2012. In vitro propagation of *Eulophia nuda* Lindl., an endangered orchid. **Scientia Horticulturae, 139**: 46-52
- PRIZÃO, L.C.; GONÇALVES, M.A.M.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. 2012. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence'. **Acta Scientiarum, 34 (2)**: 157-161.
- SAMARFARD, S.; KADIR, M.A.; KADZIMIN, S.B.; RAVANFAR, S. SAUD, H.M. 2013. Genetic stability of *in vitro* multiplied *Phalaenopsis gigantea* protocorm-like bodies as affected by chitosan. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 41 (1)**: 177-183.
- SOUTO, J.S.; MORIMOTO, J.M.; FERREIRA, W.M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, R.M. 2010. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biocências, 8 (2)**: 179-185.
- STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MULLER, T.S.; TOMCZAK, A.P.; SCHUELTER, A.R. 2009. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl.



em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, **33 (1)**: 53-59.

TAN, B.C.; CHIN, C.F.; ALDERSON, P. 2011. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews.

**Plant Cell Tiss Organ Cult**, **105**: 457-463.

VASUDEVAN, R.; STADEN, J.V. 2011. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.).

**Plant Cell Tiss Organ Cult**, **107**: 123-129.

VYAS, S.; GUHA, S.; KAPOOR, P.; RAO, I.U. 2010. Micropropagation of *Cymbidium* Sleeping Nymph through protocorm-like bodies production by thin cell layer culture.

**Scientia Horticulturae**, **123**: 551-557.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- Para realizar a germinação *in vitro* de *Cattleya elongata*, deve-se coletar frutos que não sofreram deiscência, realizar a desinfestação deste material vegetal e inocular as sementes em meio MS a 3% de sacarose ou simplificado;
- 2- Para promover o crescimento da parte aérea da plântula, as culturas devem ser mantidas em meio MS com metade das concentrações a 1,5% de sacarose ou simplificado, ambos suplementados com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Para induzir o enraizamento as culturas devem ser mantidas em meio simplificado suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado;
- 3- O BAG *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia é eficiente para conservar o germoplasma da espécie, visto que é representativo em comparação às populações naturais;
- 4- Plantas de *C. elongata* estabelecidas *in vitro* podem ser transferidas de forma eficiente para o ambiente *ex vitro*, sendo sugerida a utilização do substrato casca de *Pinus* + fibra de coco (1:1);
- 5- Para realizar a multiplicação de *C. elongata* é sugerida a utilização plântulas *in vitro* com 0,3 cm de comprimento da parte aérea, seccionadas na porção superior. Utilizando este tipo de explante não é necessário suplementar o meio nutritivo com reguladores vegetais;
- 6- A multiplicação pode ser realizada em meio nutritivo em estado líquido, sendo sugerida a utilização de suporte de algodão ou ponte de papel filtro;

- 7- Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a cultura de tecidos vegetais é uma alternativa viável tanto para propagação *in vitro*, quanto para conservar o germoplasma da espécie de *C. elongata*.

## APÊNDICE

Quadrados de análise de variância

## QUADRADOS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 1

**Quadro 1.1:** Resumo das análises de variância para germinabilidade (%) de *Cattleya elongata* em função do meio nutritivo e carvão ativado.

Causas da variação	Grau de liberdade	Quadrados médios
		% G
Meio nutritivo	1	181,04 <sup>ns</sup>
Carvão ativado	1	86,81 <sup>ns</sup>
Meio nutritivo X Carvão ativado	1	36,76 <sup>ns</sup>
Resíduo	34	180,20
CV (%)		31,90

<sup>\*\*</sup> - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>\*</sup> - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>ns</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Quadro 1.2:** Resumo das análises de variância para sobrevivência (%), matéria seca da parte aérea e matéria seca do sistema radicular de *Cattleya elongata* em função do meio nutritivo e carvão ativado.

Causas da variação	Grau de liberdade	Quadrados médios		
		%S	Matéria seca da parte aérea	Matéria seca do sistema radicular
Meio nutritivo	3	27,50 <sup>ns</sup>	14,19 <sup>**</sup>	356,90 <sup>**</sup>
Carvão ativado	1	202,50 <sup>*</sup>	35,83 <sup>**</sup>	190,47 <sup>**</sup>
Meio nutritivo X Carvão ativado	3	94,17 <sup>ns</sup>	5,84 <sup>**</sup>	34,44 <sup>**</sup>
Resíduo	32	37,81	1,05	6,49
CV (%)		6,78	24,86	35,88

<sup>\*\*</sup> - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>\*</sup> - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>ns</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Quadro 1.3:** Resumo das análises de variância para sobrevivência (%), matéria seca da parte aérea e matéria seca do sistema radicular de *Cattleya elongata* em função do meio nutritivo e carvão ativado.

Causas da variação	Grau de liberdade	Quadrados médios	
		%S	Número de brotos por planta
Tratamento	3	316,67 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	254,17	0,06
CV (%)		18,76	52,63

<sup>\*\*</sup> - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>\*</sup> - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>ns</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## QUADRADOS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 2

**Quadrado 2.1:** Resumo das análises de variância para sobrevivência (%), explantes de formaram brotos (%), número de brotos por explantes vivos, matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e do calo de *Cattleya elongata* em função dos tipos de explantes, concentrações de ANA e concentrações de BAP.

Causas da variação	Grau de liberdade	Quadrados médios					
		Sobrevivência (%)	Explantes que formaram brotos (%)	Número de brotos por explantes	Matéria seca da parte aérea	Matéria seca do sistema radicular	Matéria seca do calo
Tipos de explantes	2	305,19**	1541,60**	178,57**	0,0032**	0,0007 <sup>ns</sup>	0,0048**
Concentrações de ANA	2	56,30 <sup>ns</sup>	136,14 <sup>ns</sup>	3,86 <sup>ns</sup>	0,0057**	0,004**	0,0014**
Concentrações de BAP	2	91,85 <sup>ns</sup>	257,35 <sup>ns</sup>	42,73*	0,0021**	0,0012*	0,0001 <sup>ns</sup>
Tipos de explantes X Concentrações de ANA	4	82,96 <sup>ns</sup>	287,16*	1,32 <sup>ns</sup>	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	0,0010**
Tipos de explantes X Concentrações de BAP	4	38,52 <sup>ns</sup>	305,73*	25,76**	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0006 <sup>ns</sup>	0,0004 <sup>ns</sup>
Concentrações de ANA X Concentrações de BAP	4	29,63 <sup>ns</sup>	143,18 <sup>ns</sup>	8,42 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>	0,0009*
Tipos de explantes X Concentrações de ANA X Concentrações de BAP	8	62,96 <sup>ns</sup>	228,58*	3,74 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	0,0008**
Resíduo	108	51,85	108,60	6,96	0,0003	0,0003	0,0003
CV (%)		7,42	11,18	91,71	54,8800	64,63	216,05

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott;

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott;

<sup>ns</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

**Quadrado 2.2:** Resumo das análises de variância para sobrevivência (%), explantes de formaram brotos (%), número de brotos por explantes vivos, matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e do calo de *Cattleya elongata* em função dos diferentes sistemas de oxigenação.

Causas da variação	Grau de liberdade	Quadrados médios					
		Sobrevivência (%)	Explantes que formaram brotos (%)	Número de brotos por explantes	Matéria seca da parte aérea	Matéria seca do sistema radicular	Matéria seca do calo
Tratamentos	5	963,54**	62,93**	47,378427**	0,000011 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>	0,000331**
Resíduo	30	144,79	6,66	6,56	0,000006	9,9857E-07	0,000072
CV (%)		15,68	65,36	79,51	166,16	164,04	67,92

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey;

<sup>ns</sup> - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.