

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO
DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS**

Gilberto Rostirolla Batista de Souza

Engenheiro Agrônomo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO
DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS**

Gilberto Rostirolla Batista de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta

Coorientadores: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria

Prof. Dr. Wagner Aparecido Vendrame

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)

2015

S729d Souza, Gilberto Rostirolla Batista de
Desenvolvimento *in vitro* e criopreservação de sementes de
orquídeas / Gilberto Rostirolla Batista de Souza. -- Jaboticabal, 2015
vii, 53 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Kathia Fernandes Lopes Pivetta

Coorientadores: Ricardo Tadeu de Faria, Wagner Aparecido

Vendrame

Banca examinadora: Renata Gimenes, Marcos Vieira Ferraz,
Paulo Hercilio Viegas Rodrigues, Claudia Fabrino Machado Mattiuz
Bibliografia

1. *Amblostoma amblostomoides*. 2. *Cattleya percivaliana*. 3.
Conservação 4. Cultivo *in vitro*. 5. *Ionopsis utricularioides*. 6.
Orchidaceae. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 635.9:631.532

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "DESENVOLVIMENTO *in vitro* E CRIOPRESERVAÇÃO
DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS"

AUTOR: GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO TADEU DE FARIA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER APARECIDO VENDRAME

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



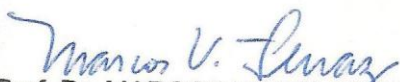
Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



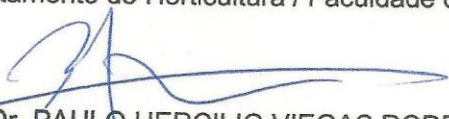
Profa. Dra. RENATA GIMENES

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MARCOS VIEIRA FERRAZ

Departamento de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



Prof. Dr. PAULO HERCILIO VIEGAS RODRIGUES

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP



Profa. Dra. CLAUDIA FABRINO MACHADO MATTIUZ

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 31 de agosto de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gilberto Rostirolla Batista de Souza – nascido em 15 de novembro de 1985, em Curitiba – PR. Doutorado na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP/FCAV - Jaboticabal – SP (2015). Mestre em Fitotecnia pela Universidade Estadual de Londrina (2012). Possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade Estadual de Londrina (2010), trabalhou em projeto de extensão em estatística, experiência em pesquisa a campo e em laboratório com plantas medicinais e ornamentais, em especial com orquídeas e flores tropicais. Realizou treinamento no desenvolvimento embriogênico de soja junto à TMG. Selecionado pelo programa BRAFAGRI, realizou um semestre do curso de graduação em engenharia agrônoma em Montpellier - França entre 2008 e 2009, onde teve oportunidade de trabalhar diretamente com produtores da região.

Epígrafe

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

(Luis Fernando Veríssimo).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Issara Rostirolla de Souza e Gilberto Batista de Souza e minha irmã Joana Rostirolla Batista de Souza pela minha formação pessoal, apoio e incentivo durante todas as etapas da minha vida.

À professora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, por ter sido mais que orientadora, uma grande amiga, e ter me recebido cordialmente e ter aberto todas as portas do conhecimento para minha formação profissional, bem como pessoal.

Aos professores Dr. Ricardo Tadeu de Faria e Wagner Vendrame não somente pela co-orientação neste trabalho, mas também pela amizade ao longo de todos estes anos.

Aos professores do Departamento de Horticultura – Produção Vegetal da UEL, pela contribuição a minha formação acadêmica e científica.

À Universidad Estadual de São Paulo – “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - SP e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal pela oportunidade de realização do Doutorado, em especial ao Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do viveiro experimental (Horto) do departamento de Produção Vegetal da UNESP e dos funcionários do laboratório de Fitotecnia da UEL pelas ajudas durante a realização do experimento.

À secretária do departamento de Produção Vegetal – Horticultura da UNESP/FCAV Rosane Aparecida Betioli Innocente pela atenção e auxílio nas questões burocráticas da formação.

À Carla Rafaela Xavier Costa pelo companheirismo durante as horas de trabalho árduo e tornar a vida acadêmica e pessoal mais divertida.

Aos amigos Renata Gimenes, Gustavo de Nobrega Romani, Renata Bachin Mazzini Guedes, Gisele Sales Batista, Daniela Merida, que foram parceiros nos diversos trabalhos elaborados durante todos esses anos e à Edilene Aparecida Preti Ferrari por auxiliar e repassar as técnicas de criopreservação estudadas.

Aos amigos Walter Maldonado Junior e Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez pelas horas de descontração e conversas dos mais variados temas.

À banca examinadora pela contribuição extremamente importante para o aprimoramento da escrita.

Gostaria de agradecer também todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais..... | 1 |
| 1.1 Introdução | 1 |
| 1.2 Revisão de literatura | 2 |
| 1.2.1. Floricultura e comercialização de orquídeas | 2 |
| 1.2.2. Família Orchidaceae | 4 |
| 1.2.3. Multiplicação <i>in vitro</i> de orquídeas | 6 |
| 1.2.4. Qualidade da luz | 9 |
| 1.2.5. Armazenamento de sementes de orquídea e criopreservação | 12 |
| 1.3 Objetivos | 15 |
| 1.4 Referências bibliográficas | 15 |
| CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de plântulas de orquídeas nativas em meio de cultura alternativo e em diferentes ambientes | 25 |
| 2.1. Resumo | 25 |
| 2.2. Abstract | 26 |
| 2.3. Introdução | 27 |
| 2.4. Material e métodos | 28 |
| 2.5. Resultados e discussão | 29 |
| 2.6. Conclusão | 32 |
| 2.7. Agradecimento | 32 |
| 2.8. Referências | 32 |
| CAPÍTULO 3 - Floroglucinol na criopreservação de sementes de orquídea nativa... 40 | |
| 3.1. Resumo | 40 |
| 3.2. Abstract | 42 |
| 3.3. Introdução | 43 |
| 3.4. Material e métodos | 44 |
| 3.5. Resultados e discussão | 46 |
| 3.6. Conclusão | 48 |
| 3.7. Referências | 48 |

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS

RESUMO – As plantas da família Orchidaceae são muito apreciadas pelo potencial ornamental, ecológico e econômico. O domínio de técnicas para a domesticação e propagação em massa das espécies é extremamente importante, visto que, possibilita diminuir a coleta predatória, além de reduzir o custo de produção das plantas. O cultivo *in vitro* é uma técnica que permite produzir grande número de plantas; entretanto, ocorrem muitas perdas durante o período de aclimatização (*ex vitro*). O aprimoramento dos métodos de conservação de recursos genéticos por meio de criopreservação de sementes em desenvolvimento é uma importante estratégia para a conservação de germoplasma e programas de melhoramento genético de plantas desta família. Este trabalho teve como objetivos avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas em meio de cultura alternativo e diferentes ambientes das orquídeas *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana*, bem como, diferentes protocolos para a criopreservação de sementes da orquídea *Lonopsis utricularioides*. Nos experimentos sobre desenvolvimento *in vitro* de plântulas em meio de cultura alternativo e diferentes ambientes, para cada espécie, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Inicialmente foram seis tratamentos (T1 - meio MS (Murashige e Skoog) + sala de crescimento - Controle; T2 – MCA (meio de cultura alternativo) + sala de crescimento; T3 - MCA + tela preta com 70% de sombreamento; T4 - MCA + tela azul com 50% de sombreamento; T5 - MCA + tela preta com 50% de sombreamento e T6 - MCA + tela vermelha com 50% de sombreamento) e quatro repetições com 10 plântulas por parcela avaliando-se porcentagem de sobrevivência; para avaliação dos dados biométricos, em razão do alto índice de mortalidade, foram avaliados quatro tratamentos para *A. amblostomoides* e três tratamentos para *C. percivaliana*, com 12 repetições para ambas as espécies, sendo uma plântula por parcela. No experimento sobre criopreservação de sementes, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado; inicialmente foram oito tratamentos: T1 - sementes não congeladas – Controle 1; T2 - sementes criopreservadas sem crioprotetores – Controle 2; T3 - glicerol 2 M (20 min) + PVS2 (10min.); T4 - glicerol 2 M (20min) + PVS2 + floroglucinol 1% (10min.); T5 - sacarose 0,4 M (20 min.) + PVS2 (10min.); T6 - sacarose 0,4 M (20min.) + PVS2 + floroglucinol 1 % (10 min.); T7 - glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20min) + PVS2 (10 min.) e T8 - glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20min.) + PVS2 + floroglucinol 1% (10 min.) e quatro repetições, sendo cada parcela representada por um frasco contendo 3 gotas de sementes, depois de descongeladas e retiradas das soluções crioprotetores, para avaliação da porcentagem de germinação; para avaliação dos dados biométricos, número plântulas e de protocormos, em razão da baixa porcentagem de formação de plântulas em alguns tratamentos, foram avaliados cinco tratamentos e quatro repetições sendo três plântulas por parcela. Em todos experimentos, foi realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os dados de porcentagens foram previamente transformados em arco-seno $(x/100)^{1/2}$ quando necessário. O meio de cultivo alternativo (MCA) contendo banana, água de coco, fertilizante NPK 10-30-20, açúcar cristal, carvão ativado e ágar pode ser recomendado para o crescimento *in vitro* de

Amblostoma amblostomoides e *Cattleya percivaliana*. O ambiente de cultivo mais adequado para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana* foi a sala de crescimento sob condições controladas. Observa-se que o uso de crioprotetores foi importante para a preservação das sementes, no entanto, o uso do floroglucinol não foi fundamental. O tratamento mais indicado foi o realizado com glicerol 2 M com sacarose 0,4 M (20 min) e PVS2 (10 min).

Palavras-chave: *Amblostoma amblostomoides*, *Cattleya percivaliana*, conservação, cultivo *in vitro*, *Lonopsis utricularioides*, Orchidaceae

IN VITRO DEVELOPMENT AND SEED CRYOPRESERVATION OF ORCHIDS

ABSTRACT – Orchids are well appreciated by ornamental, ecological and economic potential. The improvement of genetic resources conservation methods through seeds and protocorms cryopreservation is an important strategy for the conservation of germplasm and plant breeding programs of this family. The domain of techniques for domestication and mass propagation of species is very important because, enables decreasing predation and reduce the cost of production of plants. The *in vitro* culture is a technique that allows the production of a large numbers of plants; however, there are many losses during the acclimatization period (*ex vitro*). This work aimed to evaluate different protocols for cryopreservation of *Ionopsis utricularioides* seeds, as well as the *in vitro* development of seedlings in alternative culture media and different environments of the orchids, *Amblostoma amblostomoides* and *Cattleya percivaliana*. In experiments on cryopreservation of seeds for each species, the experimental design was completely randomized with eight treatments and four replications each. The treatments were: T1) seeds without cryopreservation (control 1); T2) seeds cryopreserved without cryoprotectants (Control 2); T3) glycerol + PVS2; T4) glycerol + PVS2 + phloroglucinol; T5) sucrose + PVS2; T6) sucrose + PVS2 + phloroglucinol; T7) glycerol + sucrose + PVS2; and T8) + sucrose + glycerol + PVS2 + phloroglucinol and 10 repetitions. The variables analyzed were germination percentage, number of seedlings and protocorms and development of the seedlings formed. In the experiments on *in vitro* development of seedlings in an alternative culture media and in different environments, the experimental design was completely randomized for each species. There were six treatments [T1: MS medium (Murashige e Skoog) - under laboratory conditions; T2: ACM (Alternative Culture Medium) - under laboratory conditions; T3: MCA - black net with 50% shading; T4: MCA - black net with 70% shading; T5: MCA - blue net with 50% shading and T6: MCA - red net with 50% of shading]; and four replications with five seedlings per plot. In all experiments, data were submitted to analysis of variance and the treatment means were compared by Tukey test at 5% probability; Percentages data were previously changed into $\arcsin(x/100)^{1/2}$ when necessary. The alternative culture medium containing banana, coconut water, NPK 10-30-20 fertilizer, granulated sugar, activated carbon and agar, is the most recommended for the *in vitro* growth of *Amblostoma amblostomoides* and *Cattleya percivaliana*. The most appropriate environment for the growth of *in vitro* *Amblostoma amblostomoides* and *Cattleya percivaliana* seedlings was the growth room with controlled conditions. It was observed that the use of cryoprotectants was important to preserve seeds; however, the use of phloroglucinol was not critical. The most appropriate treatment was glycerol 2 M combined with 0.4 M sucrose (20 min) and PVS2 (10 min).

Keywords: *Amblostoma amblostomoides*, *Cattleya percivaliana*, conservation, In vitro culture, *Ionopsis utricularioides*, Orchidaceae

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

As sementes das orquídeas são desprovidas de endosperma, tecido nutritivo responsável pela energia inicial da germinação. Na natureza, para que ocorra a germinação das sementes dessas plantas, é necessária uma simbiose entre certos fungos e as orquídeas (ARDITTI, 1992). Com isso, a porcentagem de sementes germinadas é baixa no habitat natural. O cultivo *in vitro* desse grupo de plantas, permite a germinação de todas as sementes viáveis e, com isso, obter grande número de plantas. Porém, ainda é um método oneroso pelos custos dos reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura.

O ambiente de crescimento é outro entrave na micropropagação de plantas devido ao alto custo para controlar e manter, no local, a temperatura e a intensidade luminosa adequadas ao desenvolvimento vegetal. Nesse sentido, a utilização de luz natural pode ser uma possibilidade para reduzir gastos.

As plantas dependem da luz para realizarem processos vitais, sendo um dos fatores de maior efeito no processo morfogênico que ocorre *in vitro*. A intensidade, qualidade e duração da luz afetam particularmente o processo fotossintético e aqueles mediados pelo fitocromo (GEORGE, 1993; HANDRO e FLOH, 1990; KOZAI et al., 1991; KODYN e ZAPATA-ARIAS, 1998).

A coleta predatória de orquídeas contribuiu significativamente para a redução de sua população (BATISTA et al., 2005) e incluiu diversas espécies na Lista Nacional Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014).

A criopreservação é o método de conservação *in vitro* a longo prazo, em que o material biológico é submetido à baixíssimas temperaturas utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (SANTOS, 2000). Para a criopreservação de orquídeas, tem-se utilizado diferentes órgãos vegetais, tais como sementes (NIKISHINA et al., 2001), protocormos (BIAN et al., 2002) e suspensão de células (TSUKAZAKI et al., 2000).

O sucesso na criopreservação depende dos diferentes níveis de tolerância ao congelamento de diferentes espécies, e mesmo entre diferentes tecidos de uma

mesma espécie. Geralmente estruturas menores são mais apropriadas, pois desidratam e congelam mais rápido e uniformemente. A desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração são etapas críticas para o sucesso da criopreservação (SANTOS, 2000).

A utilização dos crioprotetores aumenta a eficiência na porcentagem de sobrevivência de sementes ou outros órgãos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas em meio de cultura alternativo e diferentes ambientes das orquídeas *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana*, bem como, diferentes protocolos para a criopreservação de sementes de *Lonopsis utricularioides*.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1. Floricultura e comercialização de orquídeas

O Brasil detém uma variedade de flores e plantas ornamentais com potencial econômico extremamente importante. Esse fato somado à diversidade climática garantem sucesso na exploração deste mercado do setor agrícola (OLIVEIRA e BRAINER, 2007).

Em 1950 a criação da Cooperativa Agropecuária de Holambra foi um marco importante para o desenvolvimento da floricultura no país. Contudo a expansão significativa da produção de flores e plantas ornamentais ocorreu apenas depois da década de 90 com a criação do Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais – Frupep (incentivada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e da criação da organização não-governamental Instituto Brasileiro de Floricultura – IBRAFLO (IBGE, 2004).

A produção brasileira de flores e plantas ornamentais ocorre em pequenas propriedades. O número de produtores aumentou de 2008 para 2013 de pouco mais de 6.000 para 7.800. Contudo a área de produção não seguiu o mesmo ritmo de crescimento, passando de 11.916 ha para 13.468 ha no mesmo período, o que resultou na redução da área média de produção de 1,98 ha, em 2008, para 1,73 ha,

em 2012, por produtor. (JUNQUEIRA e PEETZ, 2008; JUNQUEIRA e PEETZ, 2014b).

O consumo de flores no mercado interno vem sendo responsável pela comercialização da quase totalidade produzida no país. Com crescimento de 12 a 15% ao ano para o período de 2008 a 2011 e ao redor de 8% ao ano para os anos subsequentes até 2013, período em que o país passou por um cenário de estagnação econômica. Desde 2008, os índices de crescimento alcançados pela floricultura foram sempre superiores ao do crescimento econômico nacional (JUNQUEIRA e PEETZ, 2013; JUNQUEIRA e PEETZ, 2014b), mostrando que a floricultura se tornou um setor seguro para investimento. Para os anos de 2014 e 2015, Junqueira e Peetz (2014b) consideram que os aspectos econômicos para o setor continuaram favoráveis, mesmo frente aos desafios econômicos que se passa no país.

As pequenas propriedades produtoras de flores e plantas ornamentais, junto aos demais setores da floricultura, movimentaram, em 2013, R\$ 5,22 bilhões de reais e marcou uma estimativa de R\$ 5,64 bilhões para o ano seguinte, mantendo o crescimento de 8% do mercado de flores no âmbito nacional. O saldo do balanço comercial brasileiro apresentou-se negativo de 2011 a 2013 e a cada ano menor que o ano anterior, em decorrência da redução das exportações, frente à crise econômica internacional e aumento das importações, atingindo US\$ -18,12 milhões de dólares. Somente as importações de mudas de orquídeas atingiram US\$ 10,739 milhões de dólares em 2013 (JUNQUEIRA e PEETZ, 2014a; JUNQUEIRA e PEETZ, 2014b).

O consumo *per capita* nacional de flores e plantas ornamentais é de US\$ 6,50, muito baixo quando comparado a outros países. Na Suíça e na Noruega, por exemplo, o consumo per capita chega a US\$ 170,00 e US\$ 143,00, respectivamente, na Alemanha US\$ 137,00, nos EUA US\$ 36,00 e na Argentina US\$ 25,00. Esse fato se deve a aspectos econômicos e culturais, os quais promovem picos de vendas em datas festivas (IBRAFLOR, 2011).

As orquídeas participam do mercado da floricultura por sua beleza, variedade de espécies e pelo valor econômico agregado. O mercado brasileiro tem vantagens na produção e comercialização dessas plantas pelo fato da existência natural de

uma diversidade ampla de gêneros e de espécies; de fatores climáticos favoráveis ao cultivo, principalmente pela temperatura e pelo regime hídrico; e por apresentar fontes de substratos variáveis, sendo a fibra de coco e a casca de pinus dois exemplos disponíveis no mercado nacional (OLIVEIRA e BRAINER, 2007). A orquideocultura obteve expressivo acréscimo de produtividade, principalmente pela introdução de novas tecnologias associadas a novas espécies e variedades disponibilizadas no mercado, refletindo um incremento do comércio destas plantas dentro e fora do Brasil (TAKANE e YANAGISAWA, 2007).

O Dia das Mães e o Dia dos Namorados concentram as duas mais importantes datas para o comércio de flores e plantas ornamentais no mercado brasileiro, sendo a composição das vendas baseada no binômio: rosas vermelhas (corte) e orquídea do gênero *Phalaenopsis* (vaso) que, tradicionalmente, domina o mercado (JUNQUEIRA e PEETZ, 2011).

1.2.2. Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é dividida em 88 subtribos, com mais de 600 gêneros e um número de espécies compreendido entre 20.000 e 35.000. No Brasil existe entre 2500 e 3500 espécies divididas em torno de 200 gêneros (JOLY, 1983; MENEZES, 1987; SUTTLEWORTH et al., 1997; TAKAHASHI, 2006; WATANABE et al., 2002).

As orquídeas são plantas herbáceas, perenes, monocotiledôneas e apresentam hábito de crescimento simpodial ou monopodial. Não são parasitas e podem ser classificadas como rupícolas (se desenvolvem sobre rochas), terrestres ou epífitas de acordo com o meio o qual se desenvolvem. As flores são compostas por três sépalas e três pétalas, sendo que dessas pétalas, uma é diferenciada e denominada labelo e tem a função de atrair agentes polinizadores (SILVA, 2003; SUTTLEWORTH et al., 1997).

As plantas do gênero *Amblostoma* apresentam caules fusiformes, sobre rizoma curto. As folhas são limitadas ao terço superior do caule e dispostas alternadas entre si e possuem formato linear-lanceoladas. As flores são albo-esverdeadas, com labelo na base ciatiforme soldado com a coluna e dividido em três lobos oblongos e obtusos ou truncados acima desta parte. Geralmente ocorrem em

árvores altas, formando grandes touceiras e preferem matas mais secas. São descritas cinco espécies, dentre elas a *Amblostoma amblostomoides* (LUZ e OLIVEIRA, 2012).

O gênero *Cattleya* é caracterizado por flores de tamanho grande e labelo não fundido à coluna, a qual apresenta-se não protrusa dorsalmente, e, também, por apresentar 4 polínias (Withner, 1988, citado por VAN DEN BERG, 1996). As plantas do gênero *Cattleya* apresentam rizomas semi-lenhosos, ligeiramente reptantes, dos quais saem um ou dois grupos de raízes e um novo ramo a cada estação de crescimento. Este ramo (ramicaule) dá origem aos pseudobulbos, que podem ser classificados como fusiformes, claviformes, achatados lateralmente ou finalmente, alongados e finos (para espécies bifoliadas). Existem dois grupos de espécies: o primeiro tem pseudobulbos fusiformes e fortemente comprimidos lateralmente e com apenas uma folha (unifolioladas), e o segundo apresenta pseudobulbos cilíndricos e clavados com duas folhas (bifolioladas), sendo que ocasionalmente surgem três folhas (Braem, 1984, citado por VAN DEN BERG, 1996). A inflorescência é geralmente terminal e as gemas florais são envolvidas por uma ou duas brácteas, nomeadas de espata. O labelo tem estrutura bem mais elaborada que as demais peças e envolve a coluna (Withner, 1988, citado por VAN DEN BERG, 1996).

Cattleya percivaliana é nativa dos Andes Venezuelanos e possui hábito rupícola. Apresentam de 2 a 5 flores com diâmetro de 10-18 cm. Esta espécie prefere locais com maior intensidade luminosa e menor quantidade de água do que outras espécies do gênero *Cattleya* (SOARES et al., 2008).

A espécie *Ionopsis utricularioides*, de modo geral, apresenta folhas que ocorrem aos pares a partir da base de um pseudobulbo pequeno, com coloração avermelhada. A planta é pequena com raízes longas e finas. As inflorescências são longas e do tipo panícula; as sépalas laterais são unidas e mais curtas que o labelo, que é relativamente largo, formando flores com cerca de 13 mm de diâmetro. Apresentam flores de coloração bastante destacada rosa a avermelhadas, em grande número e podem durar até 30 dias (CARDOSO e ISRAEL, 2005). A floração ocorre nos meses de novembro a fevereiro. Tem elevado potencial ornamental devido ao grande número de flores por panícula. *Ionopsis utricularioides* têm hábito epífita e são nativas de bioma Cerrado o que confere características de cultivo em temperaturas

variando de 20 a 35 °C e luminosidade média (50 a 60% da luz natural). O cultivo recomendado é com substrato que apresenta boa drenagem, devido ao grande número de raízes finas e longas. Não suporta excesso de umidade e conseqüente falta de oxigenação nas raízes (CARDOSO, 2014).

A polinização natural de *Lonopsis utricularioides* é afetada pelas flores que não apresentam recompensas florais aos polinizadores. Esse fato confere uma polinização insuficiente, pois as flores são raramente visitadas por polinizadores resultando, assim, em baixa produção de frutos. Esta espécie, ainda, apresenta autoincompatibilidade na polinização, dificultando a formação de sementes (MONTALVO e ACKEMAN, 1987).

1.2.3. Multiplicação *in vitro* de orquídeas

As orquídeas foram as primeiras plantas a serem propagadas *in vitro*, utilizando sementes como material de propagação, realizada por Lewis Knudson, em 1921 nos EUA (assimbioticamente) e por Noël Bernard, em 1990 na França (simbioticamente) (ARDITTI e KRIKORIAN, 1996).

As sementes de orquídeas são desprovidas de endosperma e, geralmente, dependentes de associações micorrízicas para germinação (ARDITTI, 1992). Naturalmente a porcentagem de germinação dessas sementes é ao redor de 3%, variando de uma espécie para outra (BERG, 1998). Contudo, essa dificuldade tem sido superada pela adoção de técnicas de cultura de tecidos, mais especificamente por meio da germinação assimbiótica de sementes *in vitro* (ALAM et al., 2002) e cultura de meristemas, possibilitando assim a expansão comercial.

A partir dos trabalhos de Lewis Knudson (1921), que possibilitou a reprodução de orquídeas por sementes, cultivando em meio de cultura, têm surgido inúmeras formulações desses meios visando otimizar e baratear o desenvolvimento *in vitro* dessas plantas (CAMPOS, 2004).

A técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas era restrita aos laboratórios de biotecnologia, pois demandava estruturas e materiais de elevados custos (CAMPOS, 2002). Ventura (2002) verificou que o meio de cultura MS é o mais empregado em experimentos de propagação *in vitro* de orquídeas e, também, que na maioria dos

trabalhos (quase 67% das vezes em que foi empregado) foi simplificado ou substituíram-se os sais por nutrientes formulados.

A composição do meio de cultura é essencial para a germinação e desenvolvimento das sementes e plantas cultivadas *in vitro*, pois concentra os nutrientes necessários para sua nutrição (UNEMOTO et al., 2006). Deve também dar condições de desenvolvimento para as plantas, por um período relativamente longo. Por isso, substâncias orgânicas são adicionadas ao meio de cultura para complementar as substâncias biossintetizadas pelas células vegetais e para suprir as vias metabólicas, energéticas e estruturais destas (CALDAS et al., 1998). Contudo, Campos (2002), afirmou não existir um protocolo para cada gênero ou espécie de orquídeas, fato que se mantém atual pelo grande número de gêneros e espécies a ser estudado somado ao desenvolvimento lento das plantas da família Orchidaceae, que culminam no ritmo lento em obtenção de resultados para a elaboração de protocolos específicos.

A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada e mais empregada em concentração entre 2% e 3%. Para algumas espécies é utilizado também glicose ou frutose como fontes de carbono (REGO-OLIVEIRA et al., 2003). A adição de sacarose no meio de cultura está relacionada ao incremento da biomassa pela incorporação do carbono. No entanto, o excesso de sacarose inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética (Riek et al., 1997 citados por ARAUJO et al., 2007).

No cultivo de orquídeas *in vitro* existem vários relatos da utilização de polpas de frutas na formulação de meios nutritivos, como polpa de banana (WITHNER, 1974; STANCATO et al., 2008) que foi utilizada pela primeira vez em meio de cultura para germinação de sementes de orquídeas no Brasil (ARDITTI e ERNST, 1992). Esta fruta é reconhecida como importante componente para o meio de cultivo de orquídeas. Diversos autores sugerem que a polpa da banana é o melhor suplemento para a diferenciação de órgãos e promotor do crescimento de raízes e folhas de orquídeas *in vitro* (VALMAYOR e PRICE, 1970; CALDAS et al., 1998; STANCATO et al., 2008).

O enriquecimento do meio de cultura com polpa de banana madura homogeneizada possibilitou o aumento da taxa de germinação, redução na

mortalidade dos protocormos e demonstrou estar associado à formação de maior número de folhas quando adicionado a carvão ativado em estágios de crescimento *in vitro* de *Psychmorchis pusilla* (VAZ, 2002).

O emprego desses compostos auxilia o desenvolvimento de plântulas, permitindo maior vigor e crescimento durante essa fase. A suplementação de meio de cultura para orquídeas com complexos orgânicos é um método simples, prático, benéfico e conveniente para enriquecer meio de cultivo para produção comercial (ICHIHASHI e ISLAM, 1999).

A água de coco é efetivamente utilizada como componente de meio para a cultura de tecidos desde 1941. No cultivo de sementes de orquídeas, foi verificado um efeito estimulante para *Paphiopedilum* e *Vanilla*. Ela contém um grande espectro de substâncias bioquímicas que podem atuar como fatores de crescimento isolados ou com efeito sinérgico com outras substâncias (ARDITTI e ERNST, 1992). É o aditivo que mais tem sido utilizado para várias espécies; contém sais minerais, mio-inositol e citocinina(s) e também nucleotídeos e outros compostos orgânicos (CALDAS et al., 1998).

Segundo Villalobos et al. (1994), alguns autores sugerem o meio Knudson C suplementado com 60 g L⁻¹ de polpa de banana para orquídeas do gênero *Stanhopea* e Vacin e Went suplementado com 25% (v/v) de água de coco para os gêneros *Cattleya*, *Encyclia* e *Oncidium*.

Para a obtenção de mudas comercializáveis, provenientes do cultivo *in vitro*, é necessário o desenvolvimento de diversas etapas: coleta do material vegetal, esterilização e inoculação do explante no meio de cultura *in vitro*, regeneração vegetal, multiplicação, alongação, enraizamento e aclimatização (TOMBOLATO e COSTA, 1998),

O processo de aclimatização consiste em retirar as plântulas da condição *in vitro* e transferi-las para a condição *ex vitro* (casa de vegetação), controlando os fatores que possam limitar o seu desenvolvimento, como temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Essa é uma das etapas mais complicadas, pois a plântula passa a ser exposta a possíveis infecções causadas por microrganismos (COSTA, 1998).

1.2.4. Qualidade da luz

Os processos fisiológicos das plantas são afetados pela radiação solar de acordo com a duração, intensidade e qualidade, afetando a fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo, resultando na alteração do desenvolvimento da planta e da produção de flores. A intensidade e qualidade da luz pode limitar ou otimizar esse desenvolvimento de acordo com a espécie (SHAHAK et al., 2004a; MELEIRO e GRAZIANO, 2007).

Telas de coloração preta são utilizadas na produção agrícola, principalmente no cultivo de plantas ornamentais, para reduzir a irradiação solar, pois muitas dessas espécies são plantas cultivadas a meia sombra (MEIRELLES et al., 2007). Essas telas, conferem maior sombreamento, proteção contra o vento, granizo e pragas. Elas atuam na manutenção do microclima das estufas, conferindo maior umidade relativa do ar e reduzindo a temperatura (SHAHAK et al., 2004a, 2004b). As telas geram luminosidade uniforme e atuam como filtros neutros da radiação solar, ou seja, não influenciam na qualidade da luz (OREN-SHAMIR et al., 2001).

As plantas, por meio de moléculas de clorofila, absorvem luz equivalentes ao espectro luminoso azul e vermelho (430 a 660 nm). A absorção da luz azul excita a molécula da clorofila a um estado energético mais elevado do que a absorção de luz vermelha. Já durante a absorção da luz vermelha, um dos processos que podem ocorrer, além da liberação de calor, é o processo fotoquímico, que provoca a ocorrência de reações químicas, como a fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As telas coloridas modificam a luz solar incidente, e também permitem a passagem da luz natural, podendo alterar a qualidade da luz incidente, bem como sua intensidade (SHAHAK et al., 2004a; OREN-SHAMIR et al., 2001), diferente das telas pretas.

A tela azul transmite luz verde e azul (400-540 nm) e absorve a luz vermelha (550-660 nm), as telas vermelhas transmitem luz acima de 590 nm, que correspondem à região do espectro absorvidas pelas plantas, responsáveis pela maior eficiência fotossintética (SHAHAK et al., 2004b).

As telas de coloração vermelha são responsáveis por um crescimento vegetativo mais intenso, com maior vigor, crescimento de ramos, hastes florais e

maiores frutos. O oposto é observado em telas azuis para produção de frutos (OREN-SHAMIR et al., 2001; SHAHAK et al., 2004a; STAMPS e CHANDLER, 2008).

A produção de flores e plantas ornamentais apresenta vantagens com o uso de telas coloridas, pois estas podem resultar na diminuição de tratamentos culturais, como poda, e a redução da aplicação de produtos químicos, como os reguladores de crescimento (OREN-SHAMIR et al., 2001).

As telas de coloração preta, também podem apresentar vantagens sobre as malhas coloridas. Stamps e Chandler (2008), por exemplo, conseguiram maior produtividade de folhagens ornamentais cultivadas sob telado preto, em comparação ao cultivo sob telas vermelhas, azuis ou verdes, todas com 70% de sombreamento, sem alterar a durabilidade pós-colheita das hastes.

Zancheta (2011) concluiu que o telado preto com sombreamento de 50% foi o mais eficiente para crescimento de palmeiras de açaí, seguido pelo telado vermelho com 50% de sombreamento. As maiores médias de massa seca, no entanto, foram obtidas sob telado preto com sombreamento de 30 e 50%.

Meirelles et al. (2007), não obtiveram resultados diferenciados de crescimento ou desenvolvimento quando cultivaram palmeiras-ráfia sob telas pretas com 50 e 80% de sombreamento, vermelha com 50% de sombreamento e azul com 50% de sombreamento, embora a tela azul tenha proporcionado maior crescimento inicial.

Algumas plantas têm a capacidade de se adaptarem a uma grande amplitude de regimes de luz, crescendo como plantas de sombra em locais sombreados e como plantas de sol em áreas ensolaradas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Mas também, modificações nas condições de luminosidade a que uma espécie já está previamente adaptada pode acarretar diferentes respostas em suas características fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e de crescimento (CARVALHO et al., 2006). Quando se compara plantas cultivadas sob sol pleno com plantas em locais mais sombreados, as primeiras produzem folhas muito mais espessas, e as células do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso se tornam mais longas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A intensidade luminosa pode limitar ou otimizar a produção de flores, de acordo com a espécie, além de influenciar a taxa fotossintética e consequente desenvolvimento vegetativo de plantas (MELEIRO e GRAZIANO, 2007).

Poucos estudos foram encontrados na literatura sobre a influência do ambiente no desenvolvimento de plântulas de orquídea *in vitro* ou durante a aclimatização; Araújo et al. (2009) estudaram o efeito de telas coloridas (azul e vermelha) em ambiente natural (casa de vegetação) e artificial (sala de crescimento) e sala de crescimento sem tela, visando verificar alterações anatômicas foliares e características biométricas em *Cattleya loddigesii* e verificaram que o ambiente de cultivo promove alterações anatômicas e biométricas nas plântulas; as alterações promovidas pelo cultivo em luz natural evidenciaram maior capacidade fotossintética, por meio de maior diferenciação dos tecidos clorofilianos, promovendo uma superfície foliar anatomicamente adaptada à fase de aclimatização.

Estudando o efeito do ambiente natural (casa de vegetação com sombreamento de 50% e sem sombreamento), artificial (sala de crescimento) e concentrações de sacarose no meio de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, Dignart et al. (2009) concluíram que o ambiente de cultivo altera as respostas de plântulas cultivadas *in vitro*, recomendando o uso da luz natural.

Já Pasqual et al. (2011), estudando a influência do ambiente de cultivo (natural – casa de vegetação com sombreamento de 70% e artificial – sala de crescimento) e de concentrações de silicato de cálcio no crescimento *in vitro* de *Brassavola perrine* e um híbrido do gênero *Laelia*, verificaram, para ambas orquídeas estudadas, maior desenvolvimento foi obtido em sala de crescimento.

Estudando aspectos anatômicos da orquídea *Laelia purpurata*, Silva Júnior et al. (2012) observaram maior espessura de velame quando as plantas foram cultivadas em casa de vegetação comparado com a sala de crescimento. Porém, os mesmos autores, revisando a literatura, relatam que, embora diversos trabalhos tenham confirmado efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade de luz nas plantas, as respostas variam de acordo com a espécie estudada.

As diferentes condições de luminosidade influenciam o desenvolvimento e a floração distintamente de acordo com a espécie em questão. Por essa razão, é necessário estudar os efeitos da intensidade e qualidade da radiação para contribuir

com o conhecimento dos efeitos causado nas plantas ornamentais e desenvolver, a partir dos resultados gerados, tecnologias de cultivo para os produtores (SHAHAK et al., 2004b).

1.2.5. Armazenamento de sementes de orquídea e criopreservação

Uma prática comum dos produtores de orquídeas e colecionadores é o armazenamento de pólen e sementes de orquídeas em baixas temperaturas (ARDITTI e ERNST, 1992).

Sementes de orquídeas foram primeiramente armazenadas num trabalho realizado em 1915, por Jancke, em que foram mantidas em tubos de ensaios e envelopes, em locais frio e escuro e mantiveram a viabilidade por até um ano (PRITCHARD e SEATON, 1993).

No entanto, esse período de armazenamento é curto e, no caso das sementes, ocorre perda da viabilidade com o aumento no período de armazenamento (ALVAREZ-PARDO e FERREIRA, 2006) e parece estar relacionado ao teor de água das sementes. Os mesmos autores avaliaram o armazenamento de dezesseis espécies de orquídeas armazenadas em diferentes condições de temperatura e períodos e verificaram que sementes de orquídeas armazenadas a 5 °C por até 42 meses, com teor de água próximo a 6%, tiveram redução da viabilidade quanto maior o tempo de armazenamento.

A criopreservação é o método de conservação *in vitro* a longo prazo, em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (SANTOS, 2000). Para a criopreservação de orquídeas, diferentes órgãos vegetais podem ser utilizados, tais como, protocormos (BIAN et al., 2002), suspensão de células (TSUKAZAKI et al., 2000) e sementes (NIKISHINA et al., 2001).

O sucesso na criopreservação depende dos diferentes níveis de tolerância de diferentes espécies, e mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie. Geralmente estruturas menores são mais apropriadas, pois desidratam e congelam mais rápido e uniformemente. A desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração são etapas críticas para o sucesso da criopreservação (SANTOS, 2000).

A vitrificação é um método de criopreservação que consiste em tratar o material vegetal com uma solução concentrada de lavagem inicial (glicerol 2,0 M e/ou sacarose 0,4 M). Em seguida, desidratar o material vegetal por intermédio de uma solução altamente concentrada, sendo a solução vitrificante utilizada a PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) com base em glicerol e com molaridade igual a 7,8 M e congelamento rápido. Para resgatar o material, o processo baseia-se no aquecimento rápido à 40 °C, remoção dos crioprotetores e inoculação em meio de cultivo (VENDRAME et al., 2014). É uma técnica simples e efetiva, de baixo custo e aplicável a um amplo espectro de explantes de orquídeas (GALDIANO JÚNIOR, 2013).

O método de vitrificação tem sido usado na criopreservação de sementes de *Doritaenopsis pulcherrima* (THAMMASIRI, 2000; WANG et al., 2011), híbridos do gênero *Dendrobium* (VENDRAME et al., 2007, 2008), *Phaius tankervilleae* (HIRANO et al., 2009) e *Cymbidium* spp. (HIRANO et al., 2011).

A chave para uma criopreservação com sucesso envolve a necessidade do cuidadoso controle dos procedimentos para a desidratação, permeabilidade crioprotetora e a prevenção de injúrias causadas pela toxicidade dos componentes químicos e estresse osmótico durante a desidratação. Assim, o ajuste do tempo de exposição à PVS2 é o mais importante para adquirir alto percentual de plantas sobreviventes após a vitrificação. O tempo de exposição de células de plantas à solução vitrificante é crítica para a sobrevivência, pois a desidratação excessiva pode resultar em injúria celular por químicos tóxicos e estresse osmótico excessivo dos crioprotetores, além de formação intracelular de gelo durante o congelamento (GALDIANO JÚNIOR, 2013).

O mesmo autor comenta ainda que várias metodologias têm sido propostas a fim de estabelecer protocolos para criopreservação de sementes de orquídeas, sendo que a vitrificação requer ainda muitos estudos, pois diferentes espécies têm comportamentos distintos de acordo com a umidade do material e o tempo de exposição às soluções.

Estudando a criopreservação de sementes de híbridos do gênero *Dendrobium*, submetendo as sementes à solução de vitrificação (PVS2) em temperatura ambiente e em banho de gelo por períodos de 1, 2, 3, 4 ou 5 horas, Carvalho (2006) verificou a maior porcentagem de germinação foi obtida para a

cultivar Jaquelym Thomas quando as sementes foram colocadas durante 1 hora em PVS2 em banho de gelo. Para as cultivares Sena Red, BFC Pink e W/RL, não houve diferença entre os tratamentos com PVS2, no entanto, para todas as cultivares, o tratamento de vitrificação foi essencial para a sobrevivência das sementes após a criopreservação. As sementes que germinaram desenvolveram plântulas normais após a vitrificação.

Galdiano Júnior et al. (2014) estudaram a criopreservação de sementes do híbrido do gênero *Dendrobium* ‘Dong Yai’ que foram submetidas à solução crioprotetora (PVS2) durante 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 ou 6h a temperatura de 0 °C; em seguida, foram diretamente mergulhadas em nitrogênio líquido a -196 °C durante 1h e recuperadas em meio nutritivo MS (com metade da concentração de macronutrientes), sendo avaliado o percentual de germinação após 30 dias. Sementes submetidas diretamente ao nitrogênio líquido não apresentaram germinação após a remoção da criopreservação. Para os tratamentos avaliados, o maior percentual de germinação foi observado nas sementes tratadas com PVS2 durante o intervalo de 1 a 3h (entre 51-58%), embora a maior exposição também tenha apresentado moderada germinação (39%). As sementes germinadas desenvolveram plântulas normais *in vitro* que foram aclimatizadas em casa de vegetação com mais de 80 % de sobrevivência.

Um dos principais fatores para o sucesso da vitrificação é a seleção apropriada de crioprotetores (GALDIANO, 2013). O floroglucinol, um dos mais utilizados segundo Abdelnour (1999), trata-se de um reagente pertencente ao grupo trifenol; seu comportamento durante o congelamento da água é permitir uma simetria molecular tal na formação dos cristais que reduz os danos causados nas membranas das células.

Estudando a criopreservação de sementes de híbridos de *Dendrobium* expostos aos crioprotetores, floroglucinol e Supercool X1000, Galdiano Júnior et al. (2012) observaram que floroglucinol resultou em elevada taxa de germinação de sementes *in vitro* (79%), quando comparado com Supercool X1000® e as plantas apresentaram crescimento e desenvolvimento normais; os autores concluíram então que o uso de criopreservação para o armazenamento a longo prazo de sementes de

híbridos do gênero *Dendrobium* visando conservação de germoplasma, reprodução ou uso comercial pode ter um melhor desempenho utilizando PVS2 e floroglucinol.

Galdiano Júnior et al. (2013) estudaram também o efeito dos crioprotetores, floroglucinol e Supercool X1000, na criopreservação de sementes de *Oncidium flexuosum* e verificaram que a vitrificação com PVS2 e adição de 1% de floroglucinol favoreceu a germinação (68%), enquanto que em PVS2 e 1% Supercool a germinação foi apenas moderadamente aumentada (26%); as mudas desenvolvidas *in vitro* apresentaram-se saudáveis. Os autores concluíram que a vitrificação com PVS2 durante 120 min com a adição de 1% de floroglucinol oferece um protocolo simples, seguro, e viável para a criopreservação de sementes maduras de *O. flexuosum*.

Vendrame et al. (2014) realizaram revisão bibliográfica cujo objetivo foi reportar a importância, métodos e aplicação do método de criopreservação para orquídeas. Os autores diagnosticaram de acordo com os trabalhos revisados, que essa é uma área importante, relativamente nova e encontra-se em pleno desenvolvimento, o que gera bastante discussão e requer ainda muita pesquisa em relação ao tipo de tratamento a utilizar para criopreservar e a metodologia a ser aplicada de acordo com a espécie utilizada, constatando que há grande variação de métodos para criopreservação e muitas variações nas respostas das orquídeas aos métodos de criopreservação utilizados sendo necessário o desenvolvimento de protocolos mais adequados para preservação das mesmas.

1.3 Objetivos

Avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas em meio de cultura alternativo e diferentes ambientes das orquídeas *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana*, bem como, diferentes protocolos para a criopreservação de sementes de *Lonopsis utricularioides*.

1.4 Referências bibliográficas

ABDELNOUR, A. Crioconservation de plants, estado actual de la investigacion em Costa Rica. **Agronomia Costarricense**, v. 23, n. 2, p. 205-214, 1999.

ALAM, M.K.; RASHID, M.H.; HOSSAIN, M.S.; SALAM, M.A.; ROUF, M.A. *In vitro* Seed Propagation of *Dendrobium (Dendrobium transparens)* Orchid as Influenced by Different Media. **Biotechnology**, v. 1, n. 2-4, p. 111-115, 2002.

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

ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y.; CASTRO, E.M.; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2506-2511, 2009.

ARAUJO, A. D. de; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Crescimento *in vitro* de gloxínia em diferentes formulações minerais e concentrações de sacarose. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.3, n.1, p.29-34, 2007.

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

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, Interscience publication, 1992. 691p.

ARDITTI, J.; KRICKORIAN, A. D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 122: 183–241, 1996.

BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. DE B.; PELLIZZARO, K. F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v.19, n. 2, p. 221-232, 2005.

BERG, C. Banco genético de orquídeas: diversidade e conservação. In: BANDEL, G. e Vello, N.A. **Anais Encontro sobre temas de genética e melhoramento**, n. 15, Piracicaba, SP, 1998.

BIAN, H.; WANG, J.; LIN, W.; HAN, N.; ZHU, M. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of

Dendrobium candidum by the air-drying method. **Plant Physiology**, v. 159, p. 1139-1145, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998, v. 1, 864 p.

CAMPOS, D. M. Cultura *in vitro* simplificada. **O Mundo das Orquídeas**, São Paulo, n. 36, p. 52- 53, 2004.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: Micropropagação e quimioterapia de meristemas**, Rio de Janeiro; Ed. Expressão e Cultura, 2002.

CARDOSO, J. C. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Botucatu: potencial ornamental e cultivo. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.1, p.7-13, 2014.

CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.169-173, 2005.

CARVALHO, N. O. S.; PELACANI, C. R.; RODRIGUES, M. O. S.; CREPALDI, I. C. Crescimento inicial de plantas de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) em diferentes níveis de luminosidade. **Revista Árvore**, v. 30, n. 3, p. 351-357, 2006.

CARVALHO, V.S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006, 69 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

COSTA, A.M.M. Fisiologia da aclimatização. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (Coord.) **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

Disponível em: <
http://www.hortica.com.br/artigos/2014/Consumo_Interno_Flores_2013.pdf >. Acesso em: 12 agosto 2015.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de ***Cattleya walkeriana***. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.3, p.780-787, 2009.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas**. 2013, 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

GALDIANO JÚNIOR, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, v.148, p.154–160, 2012.

GALDIANO JÚNIOR, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p.2521-2529, 2014.

GALDIANO JÚNIOR, R.F.; LEMOS, E.G.M.; VENDRAME, W.A. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p.139-148, 2013.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. Londres: Exegetics, 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa, 1990. p.99-170.

HANDRO, W.; FLOH, E.E.S.A. Organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.

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

HIRANO, T.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K.; MII, M. Wide applicability cryopreservation with vitrification method of seeds of some *Cymbidium* species. **Plant Biotechnology**, v.28, p.99-102, 2011.

IBGE - FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Caracterização do setor produtivo de flores e plantas ornamentais no Brasil, 1995-1996**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

IBRAFLO. **Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, 2011**. Disponível em: <www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=160>. Acesso em: 12 março 2015.

ICHIHASHI, S.; ISLAM, M.O. Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. **J. Japan Soc. HortScience**, v. 68, n. 1, p. 269-274, 1999.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1983.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Vendas de flores nos dias das mães e dos namorados de 2011: economia aquecida sustenta expansão do consumo. **Contexto & perspectiva**. 5p. 2011 (Boletim de Análise Conjuntural do Mercado de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil – maio/junho, 2011). Disponível em: http://www.hortica.com.br/artigos/Contexto_e_Perspectiva_Vendas_de_Flores_nos_Dias_das_Maes_e_Namorados_2011.pdf. Acesso em: 10 janeiro 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. 2013. Consumo: um conhecimento necessário para a expansão sustentável da floricultura brasileira. **JORNAL ENTREPOSTO** de agosto de 2013. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2014/Consumo_Interno_Flores_2013.pdf>. Acesso em: 12 agosto 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. 2014a. **Boletim de Análise Conjuntural do Mercado de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil Janeiro de 2014**. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2014/2013_Comercio_Exterior_Floricultura.pdf>. Acesso em: 12 agosto 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil – janeiro a dezembro de 2007. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014b.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine 1') **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 144-145, 1998.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 2, p. 107-115, 1991.

LUZ, F.J. de F.; OLIVEIRA, J. M. F. **Orquídeas de Roraima**. Editora Brasília, DF: EMBRAPA, 2012. 181p.

MEIRELLES, A. J. A.; PAIVA, P. D. O.; OLIVEIRA, M. I.; TAVARES, T. S. Influência de diferentes sombreamentos e nutrição foliar no desenvolvimento de mudas de palmeira ráfia *Rhapis excelsa* (Thunberg) Henry ex. Rehder. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1884-1887, 2007.

MELEIRO, M.; GRAZIANO, T. T. Desenvolvimento de tapeinóquilo em diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 63-72, 2007.

MENEZES, L. C. ***Cattleya labiata* Lindley**: orquídeas brasileiras. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1987. 112p.

MMA – Ministério do Meio Ambiente, 2014. **Lista Nacional Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção de Dezembro de 2014**. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2014/p_mma_443_2014_lista_esp%C3%A9cies_amea%C3%A7adas_extin%C3%A7%C3%A3o.pdf [Acesso em 11 de Agosto de 2015].

MONTALVO, A.M.; ACKEMAN, J.D. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **Biotropica**, v.19, n.1, p.24-31, 1987.

NIKISHINA, T. V.; POPOV, A. S.; KOLOMEITSEVA, G. L.; GOLOVKIN, B. N. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 231–233, 2001.

OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. C. P. Floricultura: Caracterização e Mercado. **Banco do Nordeste do Brasil; série Documentos do Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE**, Fortaleza, 2007.

OREN-SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES F. A.; ARAUJO A. G.; SANTOS R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento in vitro de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.1, p.324-329, 2011.

PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: Historical perspective, current status, and future prospects for long- term conservation. **Selbyana** 14:89-104, 1993.

REGO-OLIVEIRA, FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento in vitro de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Semina**, Londrina, v. 24, p. 265 – 272, 2003.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; COHEN, Y.; LURIE, S.; STERN, R.; KFIR, S.; NAOR, A.; ATZMON, I.; DORON, I.; GREENBLAT-AVRON, Y. ColorNets: a new approach for light manipulation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 636, p. 609-616, 2004a.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. ColorNets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 659, p. 143-151, 2004b.

SILVA, E. F. **Multiplicação e Crescimento in vitro de Orquídeas *Brassiocattleya Pastoral X Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 73p. Dissertação. (Mestrado em

Agronomia). Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras-MG.

SILVA JÚNIOR, J. M.; CASTRO, E. M.; RODRIGUES, M.; PASQUAL, M.; BERTOLUCCI, S. K. V. Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. Carnea cultivada in vitro sob diferentes intensidades e qualidade spectral de luz. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.480-486, 2012.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F.A.; ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes. **Revista Ceres**, v.55, n. 1, p. 49-53, 2008. <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3288/1175>

STAMPS, R. H.; CHANDLER, A. L. Differential effects of colored shade nets on three cut foliage crops. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 770, p. 169-176, 2008.

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

SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 5 ed., Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, p. 158, 1997.

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

TAKAHASHI, L. S. A. **Desenvolvimento de cultivares de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) para o norte do Paraná**. Tese (Doutorado em Agronomia) Pós-graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, p. 60, 2006.

TAKANE, R. J.; YANAGIZAWA, S. S. **Cultivo moderno de orquídeas: Phalaenopsis**. São Paulo, Editora Associação João Meinberg de Ensino de São Paulo. 2007. p.130.

THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thi orchid (*Doritis pulcherrima* Lind.) by vitrification. *Cryo Lett.*, v.21, p. 237-244, 2000.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (Coord.) **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72p.

- TSUKAZAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1160-1164, 2000.
- UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore - (Gesneriaceae). **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 4, p. 503-506, 2006.
- VALMAYOR, H.L.; PRICE, G.R. Banana fruit pulp: a good medium for growing orchids. **Agriculture at Los Banos**, v.9, n.4, p.142-152, 1970.
- VAN DEN BERG, C. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae-Laeliinae)**. 1996, p. 154, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. <http://cassiovandenbergl.yolasite.com/resources/tese-mestrado.pdf>
- VAZ, A. P. A. **Crescimento vegetativo e floral de plantas de *Psychmorchis pusilla* (ORCHIDACEAE)**. 2002, 139f. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Scientia Horticulture**, v. 114, p. 188-193, 2007.
- VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience**, v. 43, p. 264-267, 2008.
- VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T.; SORACE, M.; SAHYUN, S. A. Review - Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.
- VENTURA, G. M. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***. 2002, p. 147, Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G.
- VILLALOBOS, A.L.; MUÑOZ, J.M.; SOSA-MOSS, C. Cultivo de tijos de orquídeas: *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Stanhopea*. **Revista Chapingo**, v.1, p. 58-62, 1994.

WANG, R.X.; SONG, X.Q.; HE, M.G.; SONG, S.Q. Development changes of cryotolerance associated with stored reserve accumulation of *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae) seeds. **Seed Science and Technology**, v.39, p.271-281, 2011.

WATANABE, D.; MORIMOTO, M.S.; KIHARA, G.T.E.; MORIMOTO, L.M. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo, Associação Orquidófila de São Paulo, p. 296, 2002.

WHITNER, C.L. The *Cattleyas* and their relatives. The *Cattleyas*, v.1. **Timber Press**, Portland., 1974.

ZANCHETA, A. A. **Desenvolvimento de mudas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sob telas de diferentes cores e condições de luminosidade**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2011. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', 2011.

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de plântulas de orquídeas nativas em meio de cultura alternativo e em diferentes ambientes

2.1. Resumo

A germinação das sementes de orquídeas na natureza necessita da simbiose com certos fungos, não havendo esta necessidade quando é realizada a sementeira *in vitro*, no entanto, este método ainda é oneroso, pois necessita de infraestrutura adequada. Outro entrave no cultivo *in vitro* é o ambiente de crescimento, devido ao alto custo para controlar e manter a temperatura e a intensidade luminosa adequadas ao desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* (Hoehne) e de *Cattleya percivaliana* O'Brien em meio de cultivo alternativo e em diferentes ambientes, visando minimizar os gastos do produtor com meios de cultura e energia elétrica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Inicialmente foram seis tratamentos (T1 - meio MS (Murashige e Skoog) + sala de crescimento - Controle; T2 – MCA (meio de cultura alternativo) + sala de crescimento; T3 - MCA + tela preta com 70% de sombreamento; T4 - MCA + tela azul com 50% de sombreamento; T5 - MCA + tela preta com 50% de sombreamento e T6 - MCA + tela vermelha com 50% de sombreamento) e quatro repetições com 10 plântulas por parcela avaliando-se porcentagem de sobrevivência; para avaliação dos dados biométricos, em razão do alto índice de mortalidade, foram avaliados quatro tratamentos para *A. amblostomoides* e três tratamentos para *C. percivaliana*, com 12 repetições para ambas as espécies, sendo uma plântula por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O meio de cultivo alternativo (MCA) contendo banana, água de coco, fertilizante NPK 10-30-20, açúcar cristal, carvão ativado e ágar pode ser recomendado para o crescimento *in vitro* de *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana*. O ambiente de cultivo mais adequado para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana* foi a sala de crescimento sob condições controladas.

Palavras chave: *Amblostoma amblostomoides*; *Cattleya percivaliana*; cultivo *in vitro*; fonte alternativa de nutrientes; luz natural; Orchidaceae

2.2. Abstract

The germination of orchid seeds in nature requires the symbiosis with certain fungi, with no need for this if the seeding is performed *in vitro*, however, this method is also onerous, since it requires adequate infrastructure. Another restriction in the *in vitro* culture is the growth environment because of the high cost to control and maintain the temperature and light intensity appropriate for plant development. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* development of seedlings of *Amblostoma amblostomoides* (Hoehne) and *Cattleya percivaliana* O'Brien in alternative culture media and in different environments to minimize the producer's costs of culture media and electric energy. The experimental design was completely randomized. Initially there were six treatments [T1: MS medium (Murashige e Skoog) - under laboratory conditions; T2: ACM (Alternative Culture Medium) - under laboratory conditions; T3: MCA - black net with 50% shading; T4: MCA - black net with 70% shading; T5: MCA - blue net with 50% shading and T6: MCA - red net with 50% of shading] and four replications. Data were submitted to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% probability. The alternative culture medium containing banana, coconut water, NPK 10-30-20 fertilizer, granulated sugar, activated carbon and agar, is the most recommended for the *in vitro* growth of *Amblostoma amblostomoides* and *Cattleya percivaliana*. The most appropriate environment for the growth of *in vitro* *Amblostoma amblostomoides* and *Cattleya percivaliana* seedlings was the growth room with controlled conditions.

Key words: alternative source of nutrients; *Amblostoma amblostomoides*; *Cattleya percivaliana*; *in vitro* culture; natural light; Orchidaceae

2.3. Introdução

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas em número de espécies, incluindo cerca de 850 gêneros e 20.000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). No Brasil há em torno de 2.350 espécies descritas (MENEZES, 1987).

As sementes das orquídeas são desprovidas de endosperma, tecido nutritivo responsável pela energia inicial da germinação. Na natureza, para que ocorra a germinação, é necessária a simbiose entre certos fungos e as sementes de orquídeas. Esta dificuldade é superada pelo cultivo *in vitro*, podendo-se obter grande número de plantas (ARDITTI, 1992). No entanto, essa simbiose é dispensada quando a semente é feita *in vitro*. Porém, este ainda é um método oneroso pelos custos dos reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura, frascos de cultura e energia elétrica (JUNGHANS et al., 2009).

O ambiente de crescimento é outro entrave no cultivo *in vitro* de plantas devido ao alto custo para controlar e manter, no local, a temperatura e a intensidade luminosa adequadas ao desenvolvimento vegetal (JUNGHANS et al., 2009). Nesse sentido, a utilização de luz natural pode ser uma possibilidade para reduzir gastos.

As plantas dependem da luz para realizarem processos vitais, sendo um dos fatores de maior efeito no processo morfogênico que ocorre *in vitro*. A intensidade, qualidade e duração da luz afetam particularmente o processo fotossintético (GEORGE, 1993; HANDRO e FLOH, 1990; KOZAI et al., 1991; KODYN e ZAPATA-ARIAS, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* (Hoehne) e de *Cattleya percivaliana* O'Brien em meio de cultivo alternativo e em diferentes ambientes, visando minimizar os gastos do produtor com meios de cultura e energia elétrica.

2.4. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Ornamentais, do Departamento de Produção Vegetal, e no Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e Florestais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP/FCAV), em Jaboticabal/SP, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram seis tratamentos [T1: meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) mantidas em sala de crescimento, sendo a testemunha; T2: MCA (Meio de Cultura Alternativo) em sala de crescimento; T3: MCA em ambiente de tela preta com 50% de sombreamento; T4: MCA em ambiente de tela preta com 70% de sombreamento; T5: MCA em ambiente de tela azul com 50% de sombreamento e T6: MCA em tela vermelha com 50% de sombreamento] e quatro repetições; cada parcela foi constituída de 1 frasco contendo 10 plântulas.

Foi realizada a semeadura *in vitro* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) para obter plântulas de ambas as espécies. Posteriormente, quando as plântulas apresentaram comprimento da parte aérea de $1,0 \pm 0,2$ cm, foram transplantadas para frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio MS ou meio de cultura alternativo (MCA). O MCA continha 150 g L^{-1} de banana nanica (*Musa cavendishii*), 200 mL L^{-1} de água de coco (*Cocos nucifera*) *in natura*, 3 g L^{-1} do fertilizante NPK 10-30-20 (HydroFert®), 20 g L^{-1} de açúcar cristal, 2 g L^{-1} de carvão ativado e 8 g L^{-1} de ágar, sendo que o pH foi ajustado para 5,8, conforme o tratamento.

Os frascos dos tratamentos T1 e T2 foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa incidente de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura controlada de 25 ± 2 °C; e os frascos dos tratamentos T3, T4, T5 e T6 foram colocados em telados em forma de túnel tipo arco, sem cobertura plástica, no Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e Florestais, revestidos com telas de diferentes cores e níveis de sombreamento de acordo com os respectivos tratamentos. As temperaturas e umidades relativas em cada telado apresentaram o

comportamento descrito na tabela 1 e foram obtidas através de um termo-higrômetro digital.

As plântulas foram mantidas nos tratamentos por 80 dias, nos meses de Outubro a Janeiro. Inicialmente avaliou-se porcentagem de sobrevivência. Para avaliação dos dados biométricos (número de brotos e de folhas/broto; comprimento da parte aérea; número de raízes; comprimento e diâmetro da maior raiz), em razão do alto índice de mortalidade, foram avaliados quatro tratamentos para *A. amblostomoides* e três tratamentos para *C. percivaliana*; foram consideradas 12 repetições para ambas as espécies, sendo uma plântula por parcela.

Os dados de porcentagem de sobrevivência foram transformados em arc-seno $(x/100)^{1/2}$ e de número de brotos, folhas e raízes foram transformados em $(x + 1,0)^{1/2}$ anterior à análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.5. Resultados e discussão

A porcentagem de sobrevivência da orquídea *Amblostoma amblostomoides* foi maior em meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) não diferindo do desenvolvimento em meio de cultura alternativo em tela preta 70% (T4). As plântulas não sobreviveram quando colocadas em ambientes com sombreamento de 50%, exceto em tela azul que apresentou taxa de 50% de sobrevivência (Tabela 2).

Já para a orquídea *Cattleya percivaliana*, a taxa de sobrevivência de plântulas foi maior em meio de cultura MS em sala de crescimento (T1), meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) e em meio de cultura alternativo em tela preta 70% (T4). As plântulas desta orquídea não sobreviveram quando colocadas em ambientes com sombreamento de 50% (Tabela 2).

Plântulas de *A. amblostomoides* apresentaram maiores médias para as variáveis biométricas comprimento da parte aérea, número de raízes e diâmetro de raiz, em ambiente da sala de crescimento com meio de cultura alternativo (T2) (Tabela 3).

As médias de número de brotos de *A. amblostomoides* foram maiores em meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) e em meio de cultura alternativo em tela preta 70% (T4) (Tabela 3).

Para número de folhas por broto, as médias foram maiores em meio MS em sala de crescimento (T1) e meio de cultura alternativo em ambiente da sala de crescimento (T2) (Tabela 3).

Maior média de comprimento da raiz de *A. amblostomoides* foi observada em meio de cultivo alternativo em sala de crescimento (T2), não diferindo do meio MS em sala de crescimento (T1) e do meio de cultura alternativo em tela azul com 50% de sombreamento (T5) (Tabela 3).

Para *Cattleya percivaliana* não houve diferença significativa entre os tratamentos para comprimento da parte aérea e diâmetro da maior raiz. Contudo, para número de brotos, número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz, os tratamentos com meio de cultura MS em sala de crescimento (T1) e meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) foram superiores ao tratamento com meio de cultura alternativo em tela preta 70% (T4) (Tabela 4).

Observa-se, portanto, que o meio de cultura alternativo contendo banana, água de coco, fertilizante NPK 10-30-20, açúcar cristal, carvão ativado e ágar esteve sempre entre as maiores médias, em todas as variáveis, tanto para *A. amblostomoides* como para *C. percivaliana* (Tabelas 2, 3 e 4) podendo ser recomendado para o crescimento inicial das plântulas destas espécies, diminuindo os custos de produção.

Resultados mostrando a eficiência do uso de frutas em meio de cultura, no desenvolvimento de plântulas, sobretudo polpa de banana e água de coco, tem sido relatado para várias orquídeas como *Laelia tenebrosa* e *Miltonia spectabilis* (STANCATO et al., 2008), o híbrido entre *Cattleya labiata* e *C. forbesii* (VIEIRA et al., 2009) e *Cattleya bicolor* (SOUZA et al., 2013), no entanto, sempre associados ao meio MS.

Relacionado ao ambiente, de modo geral, o desenvolvimento das plântulas de *A. amblostomoides* e *C. percivaliana* foi superior em sala de crescimento. As telas com sombreamento de 50% não foram adequadas para o desenvolvimento das plântulas das duas espécies estudadas (Tabelas 2, 3 e 4); somente para a variável

comprimento da raiz de *A. amblostomoides*, plântulas desenvolvidas em tela azul com 50% de sombreamento apresentou média que não diferiu do tratamento que se destacou (Tabela 3).

Tela preta com 70% de sombreamento apresentou maiores médias de porcentagem de sobrevivência que não diferiu dos tratamentos de sala de crescimento, no entanto, relacionado à qualidade da plântula, somente apresentou média que não diferiu da sala de crescimento para número de brotos de *A. amblostomoides* e comprimento da parte aérea e diâmetro da maior raiz de *C. percivaliana*.

A luz artificial propiciou maior número de folhas por broto tanto para *A. amblostomoides* (Tabela 3) quanto *C. percivaliana* (Tabela 4), assim como observado por PASQUAL et al. (2011) quando estudaram o desenvolvimento de plântulas de *Brassavola perrine* e de um híbrido do gênero *Laelia*.

Maior comprimento da parte aérea foi observado quando as plântulas de *A. amblostomoides* se desenvolveram em meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) (Tabela 3); já para *C. percivaliana* não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 4).

Semelhante ao verificado neste estudo para *A. amblostomoides*, DIGNART et al. (2009), estudando *Cattleya walkeriana*, observaram maior comprimento da parte aérea quando cultivada em sala de crescimento em comparação com ambientes externos sem e com tela de 50% de sombreamento. Da mesma maneira, ARAÚJO et al. (2009) também verificaram resultados positivos em sala de crescimento sem e com malhas azul e vermelha.

Relacionado ao número de raiz, o meio de cultivo alternativo apresentou melhor resultado em sala de crescimento para *Amb. Amblostomoides*. Para *C. percivaliana*, não houve diferença entre os meios de cultivo utilizados no ambiente sala de crescimento. Contudo, para as duas espécies estudadas, a sala de crescimento apresentou maiores médias em relação a casa de vegetação (tela preta com 70% ou tela azul com 50% de sombreamento) (Tabela 3 e 4).

ARAÚJO et al. (2009) de modo distinto ao encontrado neste trabalho, não observaram diferenças significativas no número de raízes de *Cattleya loddigesii* ao testar diferentes ambientes de crescimento, como casa de vegetação (CV), CV +

tela de sombreamento azul, CV + tela de sombreamento vermelha, sala de crescimento (SC), SC + tela de sombreamento azul e SC + tela de sombreamento vermelha.

Maior média do diâmetro da raiz de *A. amblostomoides* foi observada em meio de cultura alternativo em sala de crescimento (T2) (Tabela 3) e para *C. percivaliana* não houve diferença entre sala de crescimento (tanto em meio MS como meio alternativo) e casa de vegetação (em tela preta com 70% de sombreamento) (Tabela 4).

SILVA JÚNIOR et al. (2012), estudando aspectos anatômicos da orquídea *Laelia purpurata* observaram maior espessura de velame na raiz quando as plantas foram cultivadas em casa de vegetação comparado com a sala de crescimento. Porém, os mesmos autores, revisando a literatura, relatam que, embora diversos trabalhos tenham confirmado efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade de luz nas plantas, as respostas variam de acordo com a espécie estudada.

2.6. Conclusão

O meio de cultivo alternativo contendo banana, água de coco, fertilizante NPK 10-30-20, açúcar cristal, carvão ativado e ágar pode ser recomendado para o crescimento *in vitro* de *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana*.

O ambiente de cultivo mais adequado para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* e *Cattleya percivaliana* foi a sala de crescimento com condições controladas.

2.7. Agradecimento

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à pesquisa – Edital Universal.

2.8. Referências

ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y.; CASTRO, E.M.; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de ***Cattleya loddigesii*** L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2506-2511, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000900019&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 jun. 2015. doi: 10.1590/S0103-84782009000900019.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 898p.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de ***Cattleya walkeriana***. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.3, p.780-787, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542009000300017&script=sci_arttext>. Acesso em: 02 jul. 2015. doi: 10.1590/S1413-70542009000300017.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. Londres: Exegetics, 1993. 574p.

HANDRO, W.; FLOH, E.E.S.A. Organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Redução de custos na micropropagação. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 1ª ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. cap. 6, p.153-175.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (***Musa acuminata*** cv. 'Grand Naine'). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.55, n.2, p.141-145, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1006119114107>>. Acesso em: 30 jun. 2015. doi: 10.1023/A:1006119114107.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient

composition of the medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.25, n.2, p.107-115, 1991. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/226096508_Photoautotrophic_and_photomixotrophic_growth_of_strawberry_plantlets_in_vitro_and_changes_in_nutrient_composition_of_the_medium>. Acesso em: 20 jun. 2015.

MENEZES, L.C. **Cattleya labiata** Lindley: orquídeas brasileiras. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1987. 112p.

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

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES F. A.; ARAUJO A. G.; SANTOS R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento in vitro de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.1, p.324-329, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362011000300011>. Acesso em: 02 jul. 2015. doi: 10.1590/S0102-05362011000300011.

SILVA JÚNIOR, J. M.; CASTRO, E. M.; RODRIGUES, M.; PASQUAL, M.; BERTOLUCCI, S. K. V. Variações anatômicas de **Laelia purpurata** var. Carneia cultivada in vitro sob diferentes intensidades e qualidade spectral de luz. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.480-486, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n3/a8012cr5581.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2015. doi: 10.1590/S0103-84782012000300015.

SOUZA, G. R. B.; LONE, A.B., FARIA, R.T.; OLIVEIRA, K. S. Pulp fruit added to culture medium for in vitro orchid development. **Semina: Ciências Agrárias**. v.34, n.3, p.1141-1146, 2013. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/9947/pdf_1>. Acesso em: 02 jul. 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n3p1141.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: Adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v.67, n.1, p.51-57, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052008000100006&script=sci_arttext>. Acesso em: 02 jul. 2015. doi: 10.1590/S0006-87052008000100006.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R.T.; AGUIAR, R. S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de **Cattleya** Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, v.37, n.1, p.48-52, 2009. Disponível em: < <http://www.cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/view/264>>. Acesso em: 02 jul. 2015. doi: 10.15361/1984-5529.2009v37n1p48+-+52.

Tabela 1. Umidades relativas mínimas e máximas (U.Mín e U.Máx, respectivamente) e temperaturas mínimas, médias e máximas (T.Mín, T.Méd e T.Máx, respectivamente) dos ambientes telados nas diferentes cores e níveis de sombreamento de acordo com cada tratamento.

| Tratamentos | U. Mín | U. Máx | T. Mín | T. Méd | T. Máx |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tela preta 50 (T3) | 20,17 | 84,58 | 14,46 | 24,57 | 41,81 |
| Tela preta 70 (T4) | 23,08 | 89,67 | 16,70 | 24,49 | 35,27 |
| Tela azul (T5) | 26,71 | 90,81 | 14,42 | 25,34 | 37,56 |
| Tela vermelha (T6) | 20,00 | 44,07 | 13,96 | 23,87 | 43,31 |

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Amblostoma amblostomoides* (*Amblostoma*) e *Cattleya percivaliana* (*Cattleya*) cultivadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) e meio de cultura alternativo (MCA) em diferentes ambientes. Jaboticabal/SP, 2015.

| Tratamentos | Sobrevivência (%) | |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| | <i>Amblostoma</i> | <i>Cattleya</i> |
| MS + sala de crescimento (T1) | 62 ¹ (78,0) ² bc | 68 ¹ (86,0) ² a |
| MCA + sala de crescimento (T2) | 90 (100,0) a | 85 (99,2) a |
| MCA + tela preta 50% (T3) | 0 (0) d | 0 (0) b |
| MCA + tela preta 70% (T4) | 76 (94,0) ab | 64 (80,8) a |
| MCA + tela azul 50% (T5) | 45 (50,0) c | 0 (0) b |
| MCA + tela vermelha 50% (T6) | 0 (0) d | 0 (0) b |
| C.V. (%) | 22,06 | 28,06 |

¹Dados transformados em arc-seno $(x/100)^{1/2}$.

²Dados não transformados

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Parâmetros fitotécnicos observados em plântulas de *Amblostoma amblostomoides* cultivadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) e meio de cultura alternativo (MCA) em diferentes ambientes. NB – número de brotos; NF/B – número de folhas/broto; CPA – comprimento da parte aérea; NR – número médio de raízes; C>R – comprimento da maior raiz; \varnothing >R – diâmetro da maior raiz. Jaboticabal/SP, 2015.

| Tratamentos | Parte aérea | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| | NB | NF/B | CPA (cm) |
| MS + sala de crescimento (T1) | 1,5 ¹ (1,2) ² b | 2,1 ¹ (3,7) ² a | 1,32 b |
| MCA + sala de crescimento (T2) | 1,9 (2,8) a | 2,2 (9,6) a | 1,90 a |
| MCA + tela preta 70% (T4) | 1,8 (2,1) a | 1,8 (4,7) b | 1,50 b |
| MCA + tela azul 50% (T5) | 1,4 (1,0) b | 1,7 (1,9) b | 1,30 b |
| C.V. (%) | 12,43 | 15,08 | 24,09 |
| | Sistema radicular | | |
| | NR | C>R (cm) | \varnothing >R (mm) |
| MS + sala de crescimento (T1) | 1,4 ¹ (0,3) ² b | 0,43 ab | 0,75 b |
| MCA + sala de crescimento (T2) | 2,0 (2,8) a | 0,75 a | 1,42 a |
| MCA + tela preta 70% (T4) | 1,5 (0,8) b | 0,25 b | 0,77 b |
| MCA + tela azul 50% (T5) | 1,5 (0,7) b | 0,61 ab | 0,82 b |
| C.V. (%) | 15,79 | 35,55 | 27,62 |

¹Dados transformados em $(x+1,0)^{1/2}$

²Dados não transformados

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Parâmetros fitotécnicos observados em plântulas de *Cattleya percivaliana* cultivadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) e meio de cultura alternativo (MCA) em diferentes ambientes. NB – número de brotos; NF/B – número de folhas/broto; CPA – comprimento da parte aérea; NR – número médio de raízes; C>R – comprimento da maior raiz; \varnothing >R – diâmetro da maior raiz. Jaboticabal/SP, 2015.

| Tratamentos | Parte aérea | | |
|--------------------------------|--|---|--------------------------|
| | NB | NF/B | CPA (cm) |
| MS + sala de crescimento (T1) | 2,5 ¹ (5,93) ² a | 2,3 ¹ (22,53) ² a | 1,66 a |
| MCA + sala de crescimento (T2) | 2,4 (3,70) a | 2,3 (13,15) a | 1,51 a |
| MCA + tela preta 70% (T4) | 2,1 (3,55) b | 1,9 (9,20) b | 1,51 a |
| C.V. (%) | 13,13 | 10,70 | 18,98 |
| | Sistema radicular | | |
| | NR | C>R (cm) | \varnothing >R (mm) |
| MS + sala de crescimento (T1) | 2,5 ¹ (5,53) ² a | 1,43 a | 1,28 a |
| MCA + sala de crescimento (T2) | 2,2 (3,95) a | 1,09 a | 1,51 a |
| MCA + tela preta 70% (T4) | 1,6 (1,75) b | 0,46 b | 1,26 a |
| C.V. (%) | 21,47 | 40,49 | 28,27 |

¹Dados transformados em $(x+1,0)^{1/2}$

²Dados não transformados

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 3 - Floroglucinol na criopreservação de sementes de orquídea nativa

3.1. Resumo

A criopreservação é um método de conservação *in vitro* a longo prazo, em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para a criopreservação de sementes da orquídea *Lonopsis utricularioides* (Sw) Lindley, por meio do processo de vitrificação, visando aumentar a eficiência na porcentagem de sobrevivência de sementes com o crioprotetor floroglucinol. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado; inicialmente foram oito tratamentos: T1 - sementes não congeladas – Controle 1; T2 - sementes criopreservadas sem crioprotetores – Controle 2; T3 - glicerol 2 mol L⁻¹ (20 min) + PVS2 (10min.); T4 - glicerol 2 mol L⁻¹ (20min) + [PVS2 + floroglucinol 1%] (10min.); T5 - sacarose 0,4 mol L⁻¹ (20 min.) + PVS2 (10min.); T6 - sacarose 0,4 mol L⁻¹ (20min.) + [PVS2 + floroglucinol 1 %] (10 min.); T7 – [glicerol 2 mol L⁻¹ + sacarose 0,4 mol L⁻¹] (20min) + PVS2 (10 min.) e T8 – [glicerol 2 mol L⁻¹ + sacarose 0,4 mol L⁻¹] (20min.) + [PVS2 + floroglucinol 1%] (10 min.) e quatro repetições, sendo cada parcela representada por um frasco contendo 3 gotas de sementes, depois de descongeladas e retiradas das soluções crioprotetores, para avaliação da porcentagem de germinação; para avaliação dos dados biométricos, número de plântulas e de protocormos, em razão da baixa porcentagem de formação de plântulas em alguns tratamentos, foram avaliados cinco tratamentos e quatro repetições, sendo três plântulas por parcela. A maior porcentagem de germinação foi obtida no tratamento cujas sementes não foram criopreservadas, também, quando se utilizou glicerol combinado com sacarose e PVS2 e, ainda, com o uso do glicerol combinado com sacarose, PVS2 e floroglucinol. Observa-se que o uso de crioprotetores foi importante para a preservação das sementes, no entanto, o uso do floroglucinol não foi fundamental. O tratamento mais indicado foi o realizado com glicerol 2 M com sacarose 0,4 M (20 min) e PVS2 (10 min).

Palavras-chave: conservação, *Ionopsis utricularioides*, Orchidaceae, sementes, vitrificação

3.2. Abstract

Cryopreservation is a long-term preservation method *in vitro*, wherein the biological material is subjected to extremely low temperatures. The objective of this study was to develop protocols for cryopreservation of seeds of *Lonopsis utricularioides* orchid (Sw) Lindley, through the glazing process to increase efficiency in the percentage of seed survival with phloroglucinol cryoprotectant. The experimental design was completely randomized with eight treatments and four replications each. Initially there were eight treatments: T1) seeds without cryopreservation (control 1); T2) seeds cryopreserved without cryoprotectants (Control 2); T3) glycerol 2 mol L⁻¹ (20 min) + PVS2 (10min.); T4) glycerol 2 mol L⁻¹ (20 min) + [PVS2 + phloroglucinol 1 %] (10min.); T5) sucrose 0.4 mol L⁻¹ (20 min) + PVS2 (10min.); T6) sucrose 0.4 mol L⁻¹ (20 min) + [PVS2 + phloroglucinol 1%] (10min.); T7) [glycerol 2 mol L⁻¹ + sucrose 0.4 mol L⁻¹] (20 min) + PVS2 (10min.); and T8) [glycerol 2 mol L⁻¹ + sucrose 0.4 mol L⁻¹] (20 min) + [PVS2 + phloroglucinol 1%] (10min.) and four replicates. Each experimental plot was represented by a bottle containing 3 drops seeds under culture media, after thawed and removed from cryoprotectants solutions, to evaluate the percentage of germination. For the evaluation of biometric data, the number of seedlings and protocorm were evaluated five treatments and four replications with three seedlings per plot, due to the low percentage seedling rate in some of these treatments. The highest percentage of germination was achieved in the treatment that seeds were not cryopreserved and when glycerol is used combined with sucrose and PVS2 or the use of glycerol combined with sucrose, PVS2 and phloroglucinol. It was observed that the use of cryoprotectants was important to preserve seeds; however, the use of phloroglucinol was not critical. The most appropriate treatment was glycerol 2 M combined with 0.4 M sucrose (20 min) and PVS2 (10 min).

Keywords: conservation, *Lonopsis utricularioides*, Orchidaceae, seeds, vitrification

3.3. Introdução

As sementes de orquídeas são desprovidas de endosperma e, geralmente, dependentes de associações micorrízicas para germinação. Naturalmente, a porcentagem de germinação dessas sementes é ao redor de 3%, variando de uma espécie para outra (VAN DEN BERG, 1998). Contudo, o cultivo *in vitro* desse grupo de plantas, por meio da germinação assimbiótica, permite a germinação de todas as sementes viáveis e, com isso, obter grande número de plantas (ALAM et al., 2002; ARDITTI, 1992).

A criopreservação é um método de conservação *in vitro* a longo prazo, em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (SANTOS, 2000). Para a criopreservação de orquídeas, diferentes órgãos vegetais podem ser utilizados, tais como: protocormos (BIAN et al., 2002), suspensão de células (TSUKAZAKI et al., 2000) e sementes (NIKISHINA et al., 2001).

O sucesso na criopreservação depende do nível de tolerância da espécie ao congelamento e, até mesmo, dos diferentes tecidos dentro de uma mesma espécie. Geralmente, estruturas menores são mais apropriadas, pois desidratam e congelam mais rápido e uniformemente. Desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração são etapas críticas para o sucesso da criopreservação (SANTOS, 2000).

O floroglucinol é um reagente pertencente ao grupo trifenol. Seu comportamento durante o congelamento da água é permitir uma simetria molecular tal na formação dos cristais que reduz os danos causados nas membranas das células (ABDELNOUR, 1999).

Ionopsis utricularioides pertence à Família Orchidaceae. As folhas, em geral, ocorrem aos pares a partir da base de um pseudobulbo pequeno, com coloração avermelhada. A planta é pequena com raízes longas e finas. As inflorescências são longas e do tipo panícula; as sépalas laterais são unidas e mais curtas que o labelo, que é relativamente largo, formando flores com cerca de 13 mm de diâmetro. Apresentam flores de coloração bastante destacada rosa a avermelhadas, em grande número e podem durar até 30 dias (CARDOSO e ISRAEL, 2005). A floração ocorre nos meses de novembro a fevereiro. Tem elevado potencial ornamental devido ao

grande número de flores por panícula. *Lonopsis utricularioides* têm hábito epífita e são nativas de bioma Cerrado o que confere características de cultivo em temperaturas variando de 20-35 °C e luminosidade média (50-60% da luz natural). O cultivo recomendado é com substrato que apresenta boa drenagem, devido ao grande número de raízes finas e longas. Não suporta excesso de umidade e consequente falta de oxigenação nas raízes (CARDOSO, 2014).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para a criopreservação de sementes da orquídea *Lonopsis utricularioides* (Sw) Lindley, por meio do processo de vitrificação, visando aumentar a eficiência na porcentagem de sobrevivência de sementes com o crioprotetor floroglucinol.

3.4. Material e métodos

O experimento foi desenvolvido na Universidade Estadual de Londrina (UEL), no Paraná, e na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (FCAV/UNESP), campus de Jaboticabal/SP.

As sementes de *Lonopsis utricularioides* (Swartz) Lindley, provenientes de 50 cápsulas, foram obtidas por meio de polinização artificial cruzada de plantas pertencentes à coleção da FCAV/UNESP. O teor médio de água inicial das sementes foi de 12,39%. Para determinar o teor de água foram utilizadas 4 amostras contendo 0,02 g de sementes secas em estufa de circulação forçada de ar por 24 horas a 60 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foram oito tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos utilizados foram: T1) sementes não criopreservadas (Controle 1); T2) sementes criopreservadas sem crioprotetores (Controle 2); T3) glicerol + PVS2; T4) glicerol + [PVS2 + floroglucinol]; T5) sacarose + PVS2; T6) sacarose + [PVS2 + floroglucinol]; T7) [glicerol + sacarose] + PVS2; e T8) [glicerol + sacarose] + [PVS2 + floroglucinol] e quatro repetições, sendo cada parcela representada por um frasco contendo 3 gotas de sementes.

As concentrações das soluções utilizadas nos tratamentos e os tempos de exposição em cada foram: glicerol a 2 mol L⁻¹ e/ou sacarose 0,4 mol L⁻¹ por 20

minutos; PVS2 e/ou floroglucinol 1% por 10 minutos. A solução de vitrificação PVS2 é composta por 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose.

Para o teste de germinação, foram armazenados 0,02 g de sementes, em criotubos Nalgene com 2 mL de capacidade, que foram submetidas aos tratamentos. Os criotubos foram mantidos fechados nas caixas de criopreservação Nalgene e criopreservados em nitrogênio líquido por 24 horas. Após esse período, os criotubos foram descongelados de acordo com VENDRAME e FARIA (2011). As sementes foram semeadas em 50 mL de meio de cultura MS, com metade da concentração dos macronutrientes, solidificado com ágar 0,6% e pH 5,8, em frascos com capacidade de 250 mL. Após, foram mantidas na sala de crescimento durante um mês para avaliar a porcentagem de germinação.

Para cada frasco foram distribuídas três gotas da suspensão contendo as sementes em 2 mL de água destilada e autoclavada de cada tratamento. Para avaliar a porcentagem de germinação, foram tiradas fotos com auxílio de câmera fotográfica modelo H50 da Sony e realizadas as contagens das sementes germinadas em relação ao total de cada gota com auxílio do software 'ImageJ'.

No final do experimento, após sete meses que as sementes foram retiradas da criopreservação e colocadas em meio de cultura, foram contabilizados o número de plântulas e número de protocormos formados.

Foi avaliado também, após sete meses de cultivo, o desenvolvimento das plântulas formadas. Neste caso, como não houve plântulas formadas nos tratamentos 3, 4 e 5, foi considerado cinco tratamentos e quatro repetições sendo três plântulas/parcela. Os dados biométricos analisados foram: número de brotos, altura da plântula, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento médio de raízes, área foliar e massa seca da plântula.

3.5. Resultados e discussão

Maior porcentagem de germinação foi obtida no tratamento cujas sementes não foram criopreservadas (T1), também, quando se utilizou glicerol + sacarose + PVS2, (T7) e, ainda, com o uso do glicerol + sacarose + PVS2 + floroglucinol (T8) (Tabela 1). Observa-se que o uso de crioprotetores foi importante para a preservação das sementes, no entanto, o uso do floroglucinol não foi fundamental já que o tratamento que continha glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 (10 min) (T7), sem o floroglucinol, também proporcionou maior porcentagem de germinação (Tabela 1).

As sementes de *Ionopsis utricularioides* sobreviveram quando criopreservadas em nitrogênio líquido sem crioprotetores, apesar da baixa porcentagem (Tabela 1). As sementes podem ter apresentado essa sobrevivência por apresentarem baixos teores de água. HIRANO et al. (2005), trabalhando com sementes da orquídea *Bletilla striata*, relatam que o teor de água nas sementes é um fator significativo na mortalidade dos embriões e, quanto maior a quantidade de água nas sementes, maior a formação de cristais que danificam as membranas celulares, causando a morte do embrião.

Analisando o total de número de plântulas formadas somado ao número de protocormos formados no final do experimento, é possível observar que os dados apresentaram comportamento semelhante daqueles obtidos para a porcentagem de germinação. Porém quando analisados separado, os dados do número de plântulas formadas para o tratamento sem crioprotetores (T1) reduz drasticamente, permanecendo vivas apenas na forma de protocormos (Tabela 1).

A desidratação resultante do uso da solução de PVS2 a 0 °C é um passo fundamental para a sobrevivência e recuperação do material criopreservado (GALDIANO JR. et al., 2012; GALDIANO JR. et al., 2014). Contudo, para *Ionopsis utricularioides*, foi essencial passar também pelas soluções de glicerol e sacarose antes da PVS2 para o sucesso da germinação das sementes. SURENCISKI et al. (2012) obtiveram sucesso na germinação de sementes de *Cyrtopodium hatschbachii* criopreservadas com o método de encapsulação quando passaram por um pré-tratamento com sacarose.

Observa-se na Tabela 2 que, de modo geral, os tratamentos contendo sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 + floroglucinol 1% (10 min) (T6) e glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 (10 min) (T7) apresentaram maiores médias para todos os dados biométricos avaliados relacionados à parte aérea exceto para área foliar, que foi melhor para (T6). Para os dados relativos ao sistema radicular, os melhores resultados obtidos foram nos tratamentos contendo sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 + floroglucinol 1% (10 min) (T6) e com glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 (10 min) (T7) (Tabela 3).

O número médio de brotos foi igual a 1 para todos os tratamentos e não apresentaram diferenças entre eles (Dados não apresentados na tabela).

GALDIANO JR et al. (2013) concluíram que não foram observadas diferenças no desenvolvimento das plântulas obtidas de sementes criopreservadas ou não de *Oncidium flexuosum* dentre os diversos métodos utilizados no trabalho.

VENDRAME e FARIA (2011) concluíram que existe um possível efeito sinérgico do floroglucinol quando combinado com glicerol e PVS2, que beneficiam a sobrevivência das células dos protocormos de *Dendrobium nobile*. Neste trabalho não foi verificado esse efeito nas sementes de *Lonopsis utricularioides* (Tabela 1).

Assim como verificado por GALDIANO JR et al. (2012) para *Dendrobium Swartz*. 'Dong Yai', todas as plântulas de *Lonopsis utricularioides* formadas neste experimento apresentaram crescimento e desenvolvimento normal e, também, similares ao controle, mesmo havendo diferenças entre as características agrônômicas conforme as tabelas 2 e 3.

A partir de uma análise geral dos resultados obtidos, observa-se que o tratamento contendo glicerol 2 M + sacarose 0,4 M (20 min) + PVS2 (10 min) (T7) foi o que apresentou maiores médias de porcentagem de germinação (Tabela 1) e das características biométricas (Tabelas 2 e 3). HUEHNE e BHINIJA (2012) concluem que para cada espécie de orquídea existe resultados superiores de germinação e preservação de suas referidas sementes para um protocolo distinto de criopreservação.

3.6. Conclusão

O uso de floroglucinol não foi efetivo para aumentar a porcentagem de germinação, sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Lonopsis utricularioides*. O tratamento mais indicado para a criopreservação de sementes de *Lonopsis utricularioides* foi o realizado com [glicerol 2 mols L⁻¹ + sacarose 0,4 mol L⁻¹] (20 min) + PVS2 (10 min).

3.7. Referências

- ABDELNOUR, A. Criopreservación de plantas, estado actual de la investigacion en Costa Rica. **Agronomía Costarricense**, v.23, n.2, p.205-214, 1999. Disponível em: <http://www.mag.go.cr/rev_agr/v23n02_205.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2015.
- ALAM, M. K.; RASHID, M. H.; HOSSAIN, M. S.; SALAM, M. A.; ROUF, M. A. *In vitro* seed propagation of Dendrobium (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media. **Biotechnology**, v.1, n.2-4, p.111-115, 2002. Disponível em: <<http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=biotech.2002.111.115&linkid=pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.3923/biotech.2002.111.115.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- BIAN, H. W.; WANG, J.H.; LIN, W. Q.; HAN, N.; ZHU, M. Y. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. **Plant Physiology**, v.159, p.1139-1145, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S017616170470334X>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi:10.1078/0176-1617-00824.
- CARDOSO, J. C. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Botucatu: potencial ornamental e cultivo. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.1, p.7-13, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v32n1/0102-0536-hb-32-01-00007.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2015. doi: 10.1590/s0102-05362014000100002.

CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.169-173, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n2/25046.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2015. doi: 10.1590/S0102-05362005000200001.

GALDIANO JR., R. F.; LEMOS, E. G. M.; FARIA, R. T.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**. v.148, p.154–160, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423812004773>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.036.

GALDIANO JR., R. F. LEMOS, E. G. M.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.114, p.139–148, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-013-0304-4>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.1007/s11240-013-0304-4.

GALDIANO JR., R. F.; LEMOS, E. G. M.; FARIA, R. T.; VENDRAME, W. A. Seedling Development and Evaluation of Genetic Stability of Cryopreserved Dendrobium Hybrid Mature Seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.172, p.2521–2529, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-013-0699-8>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.1007/s12010-013-0699-8.

HIRANO T, GODO T, MII M, ISHIKAWA K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.23, p.534–539, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00299-004-0893-9>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.1007/s00299-004-0893-9.

HUEHNEA, P. S.; BHINIJA, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. **Scientia Horticulturae**, v.135, p.186–193, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811006224>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi:10.1016/j.scienta.2011.11.026.

NIKISHINA, T.V.; POPOV, A.S.; KOLOMEITSEVA, G.L.; GOLOVKIN, B.N. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v.378, p.231-233, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1011585801668#page-2>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.1023/A:1011585801668.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/pdfs/v12Especialp70.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

SURENCISKI, M. R.; FLACHSLAND, E. A.; TERADA, G.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. **Biocell**. v.36, n.1, p.31-36, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ar/pdf/biocell/v36n1/v36n1a02.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

TSUKAZAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, n.12, p.1160-1164, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002990000255#page-1>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi: 10.1007/s002990000255.

VAN DEN BERG, C. Banco genético de orquídeas: diversidade e conservação. In: BANDEL, G.; VELLO, N.A. **Anais do Encontro sobre Temas de Genética e Melhoramento**. Piracicaba, n.15, 1998. Disponível em: <http://www.academia.edu/6879203/1998_-_Banco_gen%C3%A9tico_de_orqu%C3%ADdeas_diversidade_e_conserva%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: 24 jun. 2015.

VENDRAME, W. A., FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**. v.128, p.131-135, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423811000033>>. Acesso em: 24 jun. 2015. doi:10.1016/j.scienta.2010.12.018.

Tabela 1. Porcentagem de germinação (%G), número de plântulas (NPL), número de protocormos (NPC) e porcentagem total de plântulas e protocormos formados (Total (%)) de *Ionopsis utricularioides*.

| Tratamentos ¹ | %G ¹ | NPL ² | NPC ² | Total (%) |
|------------------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------|
| T1) não criopreservadas | 12,50 a ³ | 1,95 (0,60) b | 27,60 (8,51) a | (9,11) |
| T2) sem crioprotetores | 2,75 b | 0,60 (0,11) c | 8,55 (1,53) ab | (1,64) |
| T3) glicerol+PVS2 | 3,05 b | 0,15 (0,04) c | 3,6 (1,03) b | (1,07) |
| T4) glicerol+PVS2+F | 0,37 c | 0,00 c | 0,00 b | (0,00) |
| T5) sacarose+PVS2 | 0,63 c | 0,00 c | 0,00 b | (0,00) |
| T6) sacarose+PVS2+F | 2,45 b | 0,15 (0,04) c | 4,80 (1,39) ab | (1,44) |
| T7) glicerol+sacarose+PVS2 | 8,31 a | 2,40 (0,65) ab | 12,00 (3,27) ab | (3,92) |
| T8) glicerol+sacarose+PVS2+F | 8,79 a | 3,75 (1,36) a | 13,05 (4,72) ab | (6,08) |
| CV (%) | 15,71 | 13,58 | 49,69 | |

Tratamentos: T1) sementes não criopreservadas (Controle 1); T2) sementes criopreservadas sem crioprotetores (Controle 2); T3) glicerol + PVS2; T4) glicerol + PVS2 + floroglucinol; T5) sacarose + PVS2; T6) sacarose + PVS2 + floroglucinol; T7) glicerol + sacarose + PVS2; e T8) glicerol + sacarose + PVS2 + floroglucinol

¹ Dados transformados em arco-seno $(x/100)^{1/2}$ somente para efeito de análise estatística (dados tabelados não-transformados).

² Dados transformados em $(x+1)^{1/2}$ somente para efeito de análise estatística (dados tabelados não-transformados ou expresso em porcentagem entre parênteses).

³ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Dados biométricos avaliados após sete meses de desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Ionopsis utricularioides*. Altura da plântula (AP); número de folhas (NF); área foliar (AF); massa seca de plântulas (MS).

| Tratamentos | AP (mm) | NF | AF (mm ²) | MS (mg) |
|------------------------------|----------|---------|-----------------------|---------|
| T1) não criopreservadas | 14.77 bc | 4.75 bc | 122.12 c | 1.71 b |
| T2) sem crioprotetores | 10.26 c | 3.67 d | 97.43 c | 0.63 b |
| T6) sacarose+PVS2+F | 21.22 a | 5.83 a | 289.97 a | 4.39 a |
| T7) glicerol+sacarose+PVS2 | 21.19 a | 5.42 ab | 214.41 b | 3.53 a |
| T8) glicerol+sacarose+PVS2+F | 16.14 ab | 4.50 cd | 143.84 c | 1.72 b |
| CV (%) | 15.02 | 16.20 | 16.24 | 19.42 |

Tratamentos: T1) sementes não criopreservadas (Controle 1); T2) sementes criopreservadas sem crioprotetores (Controle 2); T3) glicerol + PVS2; T4) glicerol + PVS2 + floroglucinol; T5) sacarose + PVS2; T6) sacarose + PVS2 + floroglucinol; T7) glicerol + sacarose + PVS2; e T8) glicerol + sacarose + PVS2 + floroglucinol

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Dados biométricos avaliados após sete meses de desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Lonopsis utricularioides*. Número de raízes (NR); comprimento da maior raiz (C>R); comprimento médio das raízes (CR).

| Trat | NR | C>R (mm) | CR (mm) |
|------------------------------|----------------------|----------|---------|
| T1) não criopreservadas | 5.42 ab ¹ | 8.80 b | 5.66 b |
| T2) sem crioprotetores | 3.25 b | 6.84 b | 4.43 b |
| T6) sacarose+PVS2+F | 6.17 a | 13.95 ab | 7.92 ab |
| T7) glicerol+sacarose+PVS2 | 6.25 a | 23.15 a | 11.15 a |
| T8) glicerol+sacarose+PVS2+F | 5.58 ab | 9.39 b | 5.88 b |
| CV (%) | 23.72 | 43.97 | 28.54 |

Tratamentos: T1) sementes não criopreservadas (Controle 1); T2) sementes criopreservadas sem crioprotetores (Controle 2); T3) glicerol + PVS2; T4) glicerol + PVS2 + floroglucinol; T5) sacarose + PVS2; T6) sacarose + PVS2 + floroglucinol; T7) glicerol + sacarose + PVS2; e T8) glicerol + sacarose + PVS2 + floroglucinol

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.