

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PACLOBUTRAZOL NO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO DE *Zygopetalum crinitum* LODD. E
Cattleya schilleriana RCHB.F. (ORCHIDACEAE) DURANTE
AS FASES *IN VITRO* E DE ACLIMATIZAÇÃO**

Renata Gimenes
Engenheira Agrônoma

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PACLOBUTRAZOL NO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO DE *Zygopetalum crinitum* LODD. E
Cattleya schilleriana RCHB.F. (ORCHIDACEAE) DURANTE
AS FASES *IN VITRO* E DE ACLIMATIZAÇÃO**

Renata Gimenes

Orientadora: Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta

Co-orientador: 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)

G491p Gimenes, Renata
Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de *Zygopetalum crinitum* Lodd. e *Cattleya schilleriana* Rchb.f. (Orchidaceae) durante as fases *in vitro* e de aclimatização. / Renata Gimenes. – – Jaboticabal, 2013
xiv, 55 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Kathia Fernandes Lopes Pivetta
Co-orientadores: Ricardo Tadeu de Faria, Wagner Aparecido Vendrame
Banca examinadora: Claudia Machado Fabrino Mattiuz, Gisele Sales Batista, Marcelo Vieira Ferraz, Maria Esmeralda Soares Payão Demattê
Bibliografia

1. Orquídea. 2. Retardante de crescimento. 3. Triazol. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 635.92:631.547

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: PACLOBUTRAZOL NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE *Zygopetalum chinatum* LODD. E *Cattleya schilleriana* RCHB.F.. (ORCHIDACEAE).
DURANTE AS FASES IN VITRO E DE ACLIMATIZAÇÃO

AUTORA: RENATA GIMENES

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA

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

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER APARECIDO VENDRAME

Aprovada 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



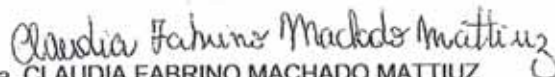
Profa. Dra. MARIA ESMERALDA SOARES PAYÃO DEMATTÊ

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



Prof. Dr. MARCELO VIEIRA FERRAZ

Coordenador(a) de Curso / Unidade de Registro / Registro/SP



Profa. Dra. CLAUDIA FABRINO MACHADO MATTIUZ

Centro Universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. GISELE SALES BATISTA

Pós-Doutoranda / Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 05 de abril de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RENATA GIMENES – nascida em 12 de maio de 1980 em Ribeirão Preto – S.P.. Filha de Vicente Gimenes Filho e Teresinha Pereira da Silva. Coursou o segundo grau na Escola Antarius na cidade de Ribeirão Preto – SP. Ingressou no curso de Agronomia em 2003, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Jaboticabal. Foi bolsista de iniciação científica no período de 2005 a 2007. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em fevereiro de 2007. Em março de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Jaboticabal. Recebeu o título de Mestre em março de 2010. Em março de 2010, ingressou como bolsista CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) no curso de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Jaboticabal. Recebeu o título de Doutor em abril de 2013.

“Lute com determinação,
abraça a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico

Aos meus avôs Vicente Gimenes (*in memorian*) e Ilda Delefrate Gimenes (*in memorian*), que foram pessoas dedicadas e amorosas na formação da minha personalidade e educação.

Ao meu pai Vicente Gimenes Filho, por torcer e acreditar no meu potencial, e à minha mãe Teresinha Pereira da Silva, pelos anos de investimento e credibilidade que depositou em mim.

À minha irmã Lislei Gimenes, pela constante presença em minha vida, alegrando os meus dias; e ao meu irmão, Diego Migliorine Gimenes, que mesmo distante de mim, está sempre em meus pensamentos.

Aos meus sogros, Luiz Ferreira Leite e Cleusa Aparecida Gonçalves Leite, pela compreensão e amizade.

Em especial, ao meu companheiro, Anderson Ferreira Leite, pela paciência e colaboração durante todos esses anos de estudo, sempre apoiando as minhas decisões.

Muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela constante presença em minha vida, me dando força e sabedoria nos momentos de dificuldade, e me mostrando o caminho certo a percorrer.

À minha orientadora Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, pelo apoio e direção que tem me dado há todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria e Prof. Dr. Wagner Aparecido Vendrame pela Co-orientação.

A CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual este trabalho não seria possível.

Aos meus amigos da Pós-graduação, Daniela Merida, Diego Silva Siqueria, Gilberto Rostirolla Batista de Souza, Gisele Sales Batista, Gustavo de Nobrega Romani, Juliana Garcia dos Santos Ichinose, Marcos Vieira Ferraz, Renata Bachin Mazzini e Vanessa Cury Galati, que estiveram ao meu lado dividindo experiências e momentos de trabalho e de alegria.

Às minhas amigas da graduação, Thaisa Diniz e Mariana Breda Pozze, obrigada pela amizade e ajuda nos experimentos.

À Cibele Mantovani, pela colaboração, contribuindo com a sua experiência na área da orquidocultura.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da defesa, Claudia Fabrino Machado Mattiuz, Gisele Sales Batista, Juliana Garcia dos Santos Ichinose, Marcelo Vieira Ferraz e Maria Esmeralda Soares Payão Demattê, pelas sugestões e correções, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

E finalmente, agradeço a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	 1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Revisão de Literatura.....	3
1.2.1. Floricultura e comercialização de orquídea.....	3
1.2.2. Família Orchidaceae.....	5
1.2.3. Gênero <i>Zygopetalum</i>	6
1.2.4. Gênero <i>Cattleya</i>	7
1.2.5. Propagação de orquídeas.....	8
1.2.6. Cultivo <i>in vitro</i>	9
1.2.7. Reguladores de crescimento.....	10
1.2.8. Paclobutrazol.....	11
1.2.9. Aclimatização.....	14
1.3. Referências.....	16
 CAPÍTULO 2 – Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. durante as fases <i>in vitro</i> e de aclimatização.....	 28
RESUMO.....	28
2.1. Introdução.....	28
2.2. Material e Métodos.....	30
2.3. Resultados e Discussão.....	32
2.4. Conclusão.....	38
2.5. Referências.....	39

CAPÍTULO 3 – Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. durante as fases <i>in vitro</i> e de aclimatização.....	42
RESUMO.....	42
3.1. Introdução.....	42
3.2. Material e Métodos.....	44
3.3. Resultados e Discussão.....	46
3.4. Conclusão.....	51
3.5. Referências.....	51

**PACLOBUTRAZOL NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE
Zygopetalum crinitum LODD. E *Cattleya schilleriana* RCHB.F. (ORCHIDACEAE)
DURANTE AS FASES *IN VITRO* E DE ACLIMATIZAÇÃO**

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 retardante de crescimento paclobutazol (PBZ) atua como inibidor de giberelinas, diminuindo a parte aérea das plantas, promovendo engrossamento nas raízes e aumentando a resistência a estresses, características estas relevantes para aclimatização de mudas com sucesso, contribuindo para altas taxas de sobrevivência. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da suplementação do meio de cultura Murashige e Skoog com PBZ, no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, e na aclimatização de plantas de *Zygopetalum crinitum* e *Cattleya schilleriana*, visando aumentar a taxa de sobrevivência *ex vitro*. O delineamento experimental (*in vitro* e *ex vitro*) foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (três concentrações de paclobutrazol: 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹ e controle); na fase *in vitro* foram 5 repetições com 5 plântulas/parcela, e na fase *ex vitro*, 5 repetições com 15 plântulas/parcela. A suplementação do meio de cultivo com PBZ promoveu em plântulas de *Z. crinitum* redução no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, e engrossamento das raízes durante a fase *in vitro*; na fase *ex-vitro*, verificou-se engrossamento das raízes, redução no comprimento e na massa de matéria seca da parte aérea. As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de PBZ não implicaram melhores taxas de sobrevivência desta orquídea. Em plântulas de *C. schilleriana* o PBZ promoveu engrossamento das raízes durante a fase *in vitro*; na aclimatização, verificou-se engrossamento das raízes e redução no comprimento da parte aérea. As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de PBZ implicaram melhores taxas de sobrevivência desta orquídea.

Palavras-chave: Orquídea, retardante de crescimento, triazol

PACLOBUTRAZOL IN GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Zygopetalum crinitum* LODD. AND *Cattleya schilleriana* RCHB.F. (ORCHIDACEAE) DURING *IN VITRO* AND ACCLIMATIZATION PHASES

SUMMARY – The plants from Orchidaceae family are very much appreciated by their ornamental, ecologic and economic potential. The mastery of domestication techniques and mass propagation of the species is extremely important since it would decrease the predatory collecting and also reducing the production cost of the seedlings. The *in vitro* cultivation is a technique that allows the production in large scale; however, the losses during the acclimatization process (*ex vitro*) can be considerable. The growth retardant paclobutrazol (PBZ) act as gibberellin synthesis inhibitor, reducing the growth of the aerial part and promoting root thickening of the plants, which may increase their resistance to stress conditions; and also being considered good characteristics for plant survival in the acclimatization phase. This work has aimed to study the effect of PBZ supplementation on Murashige and Skoog culture media in the growth and development in *in vitro* and acclimatization process of *Zygopetalum crinitum* and *Cattleya schilleriana*, aiming to increase the survival rate. The experimental design (*in vitro* and *ex vitro*) was totally randomized, with four treatments (three paclobutrazol doses: 0.5, 1.0, 1.5, mg L⁻¹ and a control); in the *in vitro* phase were performed 5 replications with 5 seedlings per plot and in the *ex vitro* one, 5 replications with 15 seedlings per plot. The paclobutrazol supplementation promoted, for *Z. crinitum* seedlings, reduction in aerial part and root length and root thickening in the *in vitro* process; in the *ex vitro* phase, it was observed root thickening and reduction in length and dry mass of the aerial part. The morphophysiological changes in the seedlings due to the PBZ application did not cause an increase in survival rates for this orchid. For *C. schilleriana* seedlings, the PBZ promoted root thickening *in vitro*; and in the acclimatization a root thickening and reduction of the aerial part length were verified. In this case, the morphophysiological changes in the seedlings due to the PBZ application promoted an increase in the survival rate.

Keywords: Orchid, growth retardant, triazol

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Aspecto da flor de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd.....	6
2 Aspecto da flor de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f.....	7
3 Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.....	32
4 Comprimento das raízes (cm) de plântulas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.....	33
5 Diâmetro das raízes (mm) de plântulas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.....	34
6 Mudas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS sem adição de paclobutrazol (PBZ) e suplementado com 1,5 mg L ⁻¹ de PBZ.....	35
7 Comprimento da parte aérea (cm) de mudas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 60 dias de aclimatização.....	35
8 Diâmetro das raízes (mm) de mudas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 60 dias de aclimatização.....	36
9 Massa de matéria seca da parte aérea (mg) de mudas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 60 dias de aclimatização.....	37
10 Taxa de sobrevivência de mudas de <i>Zygopetalum crinitum</i> Lodd. após 45 e 60 dias de aclimatização.....	38
11 Diâmetro das raízes (cm) de plântulas de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.....	46
12 Comprimento da parte aérea (cm) de mudas de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. após 60 dias de aclimatização.....	47
13 Diâmetro das raízes (mm) de mudas de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f.	

	após 60 dias de aclimatização.....	48
14	Mudas de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. após 60 dias de aclimatização provenientes de cultivo em meio MS sem adição de paclobutrazol (PBZ) e suplementado com 1,5 mg L ⁻¹ de PBZ.....	49
15	Taxa de sobrevivência de mudas de <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. após 60 dias de aclimatização.....	50

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1. Introdução

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as Angiospermas, com cerca de 700 gêneros e 30.000 espécies diferentes (MILLER; WARREN, 1996). Apresenta aproximadamente 40% das Monocotiledôneas e ocorre por quase todas as regiões do planeta (DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985). Pabst e Dungs (1975; 1977) na última revisão, apontaram cerca de 2.350 espécies e 191 gêneros para o Brasil.

O Brasil dispõe de grande biodiversidade de orquídeas, principalmente das epífitas, no entanto, muitas delas estão correndo risco de extinção, seja pela destruição do habitat, pelas coletas predatórias ou uso de produtos tóxicos, causando o desaparecimento dos polinizadores, desta forma, as plantas remanescentes em matas preservadas, não mais se reproduzem, pois não ocorre a polinização e a formação das cápsulas de sementes (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Segundo a última lista divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente, há 34 espécies de orquídeas ameaçadas de extinção no Brasil (BRASIL, 2008).

Muitas plantas da família Orchidaceae são bastante conhecidas no mercado, mas ainda apresentam alto custo de produção, inviabilizando o consumidor de adquiri-las. O desenvolvimento de técnicas de produção em massa de plantas de qualidade é muito importante para reduzir os custos tanto para o produtor quanto para o consumidor, além de promover a preservação das espécies em seu habitat.

A propagação das orquídeas pode ser vegetativa ou via semente, no caso da primeira, o número de plantas que se obtém é bastante limitado, inviabilizando o fornecimento de mudas para o mercado; já por via seminífera, há o empecilho das sementes serem diminutas e desprovidas de endosperma, necessitando de cultivo *in vitro* para a germinação assimbiótica dessas sementes.

No cultivo *in vitro* é utilizado meio de cultura que oferece condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BUTCHER; INGRAN,

1976; DIXON, 1985) e o uso adequado de reguladores de crescimento pode ser essencial tanto para a fase *in vitro* como para a aclimatização (SOUZA et al., 2003). Este cultivo apresenta vantagens como multiplicação eficiente, grande número de plantas, utilização de pequeno espaço físico e curto espaço de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Reguladores de crescimento são hormônios sintetizados quimicamente que provocam reações similares aos hormônios naturais das plantas, como alterar o crescimento e desenvolvimento das plantas (HARTMANN et al., 2002).

As giberelinas são compostos terpênicos, formados de unidades isopropênicas (TAIZ; ZEIGER, 2009), constituintes de uma classe de hormônio que influencia o desenvolvimento da planta durante todo o seu ciclo de vida. Os principais sítios de biossíntese deste hormônio são tecidos vegetativos em rápido crescimento, como, sementes e frutos em desenvolvimento (KERBAUY, 2008). De acordo com Taiz e Zeiger (2009), esta substância promove incremento na divisão celular e alongamento das células.

O paclobutrazol é um regulador de crescimento que inibe a síntese de ácido giberélico promovendo mudanças morfológicas nas plantas (SMITH; ROBERTS; MOTTLEY, 1990; ROBERTS et al., 1992; SMITH et al., 1992) que pode favorecer a aclimatização das mudas (CANTO et al., 2004). A consequência morfológica direta da inibição da giberelina é a redução do crescimento vegetativo e os efeitos que refletem na alteração da força-dreno dentro da planta, ocorrendo maior partição de assimilados (LEVER, 1986).

O uso do PBZ no cultivo *in vitro* tem sido estudado como alternativa para maior sucesso na aclimatização de mudas, contribuindo para adaptação rápida e altas taxas de sobrevivência (KOZAK, 2006; THAKUR et al., 2006; GLIOZERIS; TAMOSIUNAS; STUOPYTE, 2007), principalmente por sua capacidade de retardar o crescimento das plântulas e aumentar a resistência a estresses, como o hídrico (BANON et al., 2001; BEROVA; ZLATEV; STOEVA, 2002; ZHU; VAN-DE-PEPPEL; LI; WELANDER, 2004).

A aclimatização é a transferência das plantas da condição *in vitro* para *ex vitro*. Esta fase é bastante delicada, pois a planta é submetida a fatores externos (luminosidade, taxa de fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade) e ocorre

a conversão da condição heterotrófica para autotrófica, e um gradual retorno às características naturais da planta (DÍAZ-PÉREZ; SHACKEL; SUTTER, 1995). Estas mudanças podem comprometer a sobrevivência das mudas, resultando em perdas significativas na produção das plantas.

O Brasil é detentor de muitas espécies de orquídeas com alto potencial ornamental, e parte dessas espécies estão ameaçadas de extinção, por isso a importância do desenvolvimento de técnicas para multiplicação com sucesso.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da suplementação do meio de cultura Murashige e Skoog com paclobutrazol, no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, e na aclimatização de plantas de *Zygopetalum crinitum* e *Cattleya schilleriana*, visando aumentar a taxa de sobrevivência *ex vitro*.

1.2. Revisão de Literatura

1.2.1. Floricultura e comercialização de orquídeas

A floricultura abrange o cultivo de plantas ornamentais (envasadas e de corte), floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte (CASTRO, 1998). O cultivo de flores e plantas ornamentais é considerado uma atividade econômica relevante no agronegócio nacional e internacional, pela geração de empregos diretos e indiretos e, pelo valor de sua produção e comercialização (CANÇADO JÚNIOR; PAIVA; ESTANISLAU, 2005).

A produção e comercialização de flores e plantas ornamentais no Brasil tiveram início na década de 30, com a chegada dos imigrantes japoneses na região de São Paulo. Na década de 70, os holandeses impulsionaram a comercialização do setor com a implantação de um sistema de distribuição pelo país. A criação do Veiling Holambra em 1989 transformou o mercado, influenciando o comportamento e as práticas do setor (SALOMÉ, 2007).

O setor de floricultura, em 2009, exportou aproximadamente US\$ 31 milhões

e importou US\$ 19 milhões, tendo um superávit de cerca de US\$ 11 milhões. No ano de 2010 e 2011 houve uma queda nas vendas do setor, o superávit foi em torno de US\$ 3 milhões e US\$ 1,9 milhão, respectivamente (IBRAFLOR, 2011).

Segundo Junqueira e Peetz (2012a), a redução nas exportações de flores e plantas ornamentais se deu por causa da crise econômica nos principais mercados importadores mundiais (zona do Euro, EUA e Japão), e também pela valorização da política cambial do real, que induz à perda de competitividade das flores e plantas ornamentais no mercado mundial; no entanto, o mercado interno tem permitido sustentar o escoamento para os volumes crescentes de sua produção.

A média anual de consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil é cerca de R\$ 13,00 a R\$ 15,00 por pessoa, muito abaixo do consumo per capita europeu, estimado em US\$ 70,00 por habitante ao ano (ABCSEM, 2010). Este baixo consumo possibilita ao produtor vislumbrar um mercado interno em potencial, e, desta forma, buscar novos clientes e aumentar as vendas.

O comércio de flores e plantas ornamentais no mercado brasileiro é mais intenso nas datas que comemora o Dia das Mães e o Dia dos Namorados, sendo que, as rosas vermelhas (corte) e a orquídeas do gênero *Phalaenopsis* (vaso) lidera o mercado (JUNQUEIRA; PEETZ, 2012b).

As orquídeas mais comercializadas no Brasil pertencem aos gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Miltonia*, *Dendrobium*, *Vanda*, *Epidendrum* e *Paphiopedilum* (PASQUAL et al., 2005), sendo que, para corte, são os gêneros *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* (Denphal), *Oncidium* e *Phalaenopsis*; alguns gêneros, como *Epidendrum*, *Paphiopedilum* e *Vanda*, estão despontando nesta área (PIVETTA et al., 2013).

Em 2009, o Brasil exportou US\$ 219,86 mil de orquídeas. Os principais países de destino foram Japão (53,08%), Alemanha (21,74%), EUA (12,27%) e Holanda (8,08%), além de Ucrânia, Taiwan, Hong Kong, África do Sul e Chile (JUNQUEIRA; PEETZ, 2012a).

Os atacadistas são responsáveis por 70% das vendas das orquídeas *Phalaenopsis*, sendo que no ano de 2011 vendeu 2,5 milhões de vasos, seis vezes que o ano de 2003, em que foram vendidos 398 mil vasos (ABAFEP, 2011).

A introdução de novas tecnologias, espécies e variedades de orquídeas no Brasil, promoveram um acréscimo na produtividade destas plantas, refletindo um incremento do comércio tanto no mercado interno quanto externo (TAKANE; YANAGISAWA, 2007).

1.2.2. Família Orchidaceae

As orquídeas pertencem à classe Monocotiledônea, sendo estas plantas consideradas as mais evoluídas do reino vegetal (PAULA; SILVA, 2001), com diversas formas de adaptação aos diferentes ambientes. Podem ser epífitas, terrestres, saprófitas ou litofíticas; a maioria das espécies apresenta hábitos epifíticos (BLACK, 1984).

A família Orchidaceae é a maior de todo o reino vegetal, compreendendo aproximadamente 800 gêneros, com cerca de 24.000 espécies, as quais são distribuídas em quase todos os continentes (FAY; CHASE, 2009); as orquídeas representam por volta de 10% de todas as plantas com flores no mundo (ROBERTS; DIXON, 2008).

O Brasil apresenta grande diversidade de orquídeas, a maioria epífita, com cerca de 200 gêneros e aproximadamente 2.350 espécies. Estas plantas destacam-se pelo potencial ornamental; interesse econômico e botânico; além da importância para a indústria medicinal, cosmética e alimentícia (SILVA, 2003; ARAÚJO, 2004).

O crescimento das orquídeas pode ser monopodial (ereto) ou simpodial (prostrado) e são constituídas de raiz, caule (bulbo/pseudobulbo), folha, inflorescência, flor e fruto do tipo cápsula (DRESSLER, 1993). Apresentam raízes fasciculadas e compostas por câmbio vascular, córtex e velame, composto por duas a três camadas de células lignificadas, que pode servir como fonte de reserva (água e nutrientes) e proteção (mecânica e reflexão da radiação solar), principalmente para as raízes epífitas, as quais não possuem a proteção física do solo como as espécies terrestres (ARDITTI, 1992; ARDITTI; ERNST, 1993).

Importante na manutenção da biodiversidade, a família Orchidaceae é composta por indivíduos bioindicadores do estado de conservação das florestas, por serem sensíveis às interferências em matas primárias (PELÚZIO; SOARES, 2004; MARRARA et al., 2007) e por sua complexa interação ecológica com polinizadores e microorganismos (ROBERTS; DIXON, 2008).

Há muitas espécies de orquídeas tropicais em vias de extinção, havendo, portanto, necessidade urgente de retirá-las desta condição (FARIA et al., 2001). De acordo com a última lista divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente, existem 34 espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008). Atribui-se a diminuição das orquídeas do habitat natural à coleta predatória e ao aumento das fronteiras agrícolas (COLOMBO et al., 2005).

1.2.3. Gênero *Zygopetalum*

O gênero *Zygopetalum* apresenta aproximadamente 16 espécies; ocorre no Brasil, Peru e outros países da América do Sul. Este gênero abriga espécies de hábitos epifíticos e terrestres em altitudes moderadas de florestas úmidas. A espécie *Zygopetalum crinitum* Lodd., descrita por Loddiges, ocorre nas montanhas do sul do Brasil; é uma orquídea terrestre, com pseudobulbos ovóides parcialmente enterrados na serapilheira; apresenta folhas lanceoladas e a inflorescência pode medir até 50 cm de comprimento; as flores são perfumadas e ocorrem no final do outono até o início da primavera (GLEN, 2002).



Figura 1. Aspecto da flor de *Zygopetalum crinitum* Lodd.. Fonte: Cibeles Mantovani.

1.2.4. Gênero *Cattleya*

O gênero *Cattleya* é originário da América Tropical e Subtropical, entre México e Brasil; engloba cerca de 70 espécies e inúmeros híbridos naturais. As orquídeas desse gênero são todas epífitas de crescimento simpodial; as folhas podem ser unifoliadas ou bifoliadas, as primeiras possuem inflorescência com 2 a 6 flores grandes com labelos atrativos; a segunda possui inflorescência maior com flores pequenas (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010).

A orquídea *Cattleya schilleriana* Rchb.f. recebeu esse nome por causa de sua primeira aparição, em 1857, em Hamburgo, na Alemanha, na coleção do Cônsul de Shiller. Atualmente está extinta na natureza; era endêmica do Espírito Santo em altitudes de 400 a 800 m. A espécie apresenta pseudobulbos, folhas bifoliadas e elípticas, flores de cor marrom-esverdeado com máculas vermelho-escuras, labelo vistoso de cor amarelo ouro com estrias púrpuras (CATTLEYA... , 2013).



Figura 2. Aspecto da flor de *Cattleya schilleriana* Rchb.f.. Fonte: Cibeles Mantovani.

1.2.5. Propagação de orquídeas

Durante muitos anos, as orquídeas foram propagadas por meio de gemas ou estruturas semelhantes a gemas, pois se acreditava que suas sementes não eram viáveis (KERBAUY; HANDRO, 1980).

As plantas da família Orchidaceae, por apresentarem sementes muito pequenas e desprovidas de endosperma, necessitam de substrato infectado por fungo simbiote, para que ocorra germinação natural destas sementes, desta forma, a produção em larga escala destas plantas é dificultada. Por este motivo, técnicas de germinação de sementes *in vitro* têm sido bastante utilizadas, embora propicie elevada taxa de segregação gênica, já que a propagação é via seminífera, resultando numa população distinta da planta matriz (ARDITTI; ERNST, 1993).

O método de propagação vegetativa artificial, por meio da separação de rebentos, é uma alternativa para a manutenção de plantas com características especiais ou raras; é um processo muito lento, além de expor a planta matriz ao

ataque de fitoparasitas, ou pelas as plantas não suportarem a separação em mudas, colocando o material selecionado em risco (DIGNART, 2006).

A micropropagação é uma alternativa de reprodução *in vitro* que vem aumentando significativamente a produção comercial de orquídeas. A propagação *in vitro* tem sido utilizada para diversas orquidáceas, resultando em uma população numerosa de plantas homogêneas com características desejáveis (DIGNART, 2006).

O aprimoramento de técnicas como cultivo *in vitro*, micropropagação e estabelecimento de protocolos são fundamentais para a propagação das orquídeas, contribuindo para a preservação de espécies em extinção e a produção de grande quantidade de mudas de alta qualidade.

1.2.6. Cultivo *in vitro*

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*, baseando-se nas proporções exigidas para cada espécie (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). A composição do meio de cultura, em geral, é de macro e micronutrientes minerais, vitaminas, açúcares, reguladores de crescimento e suplementos orgânicos (KNUDSON, 1946; VACIN; WENT, 1949; WHITE, 1951; MURASHIGE; SKOOG, 1962; GAMBORG, 1984). Assim, vários compostos são adicionados para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais da célula.

No caso de plantas da família Orchidaceae, o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é muito utilizado para o cultivo *in vitro* de espécies de vários gêneros, como *Cattleya* sp. (TORRES; MOGOLLÓN, 2002), *Dendrobium* sp. (SOBHANA; RAJEEVAN, 2002), *Paphiopedilum* sp. (CHEN et al., 2002), *Ipsea* sp.

(MARTIN, 2003), *Cymbidium* sp. (YANG et al., 2009), *Phalaenopsis* sp. (LEE; CHEN; HUANG, 2010), entre outros.

O ambiente *in vitro* é caracterizado pelo cultivo em frascos estéreis que permitem pouquíssimas trocas gasosas com o ambiente, apresentam umidade relativa excessiva, alta concentração de etileno e baixa concentração de CO₂ (ERIG; SCHUCH, 2005), e as plântulas são mantidas em baixa luminosidade, além de a sacarose constituir a maior fonte de energia metabólica utilizada por essas plântulas (KODYN; ZAPATA-ARIAS, 1998; ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1999; ARIGITA; GONZALEZ; TAMÉS, 2002).

As plântulas cultivadas *in vitro*, em função das condições do ambiente desfavoráveis para a realização de fotossíntese, mostram-se com metabolismo de carbono predominantemente hetero ou mixotrófico, sendo sacarose a principal fonte de carbono e energia para seu crescimento e desenvolvimento (DEC CETTI, 2004). A sacarose é importante para a organogênese *in vitro*, influenciando no crescimento, no ciclo celular e nos processos de diferenciação (VAZ; KERBAUY; RIBEIRO, 1998); o uso de elevadas concentrações no meio de cultura tem sido considerado uma das principais causas da redução das taxas fotossintéticas *in vitro* (LANGFORD; WAINWRIGHT, 1987), promovendo altas taxas de mortalidade na aclimatização

1.2.7. Reguladores de crescimento

Os processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas são controlados por hormônios produzidos em um sítio e translocado a outros sítios, visando alterar o crescimento e o desenvolvimento. Hormônios vegetais são substâncias naturais produzidas pela própria planta, e, reguladores de crescimento, são hormônios sintetizados quimicamente que provocam reações similares àqueles causados pelos naturais. Os hormônios naturais de plantas mais comumente conhecidos são as auxinas, giberelinas, citocininas, o etileno e o ácido abscísico (HARTMANN et al., 2002) e os descobertos mais recentemente são as poliaminas, o ácido jasmônico,

brassinosteróides, ácido salicílico e oligossacarídeos (ARNOLD et al., 2002; JIMÉNEZ, 2005).

Os reguladores de crescimento são substâncias que, mesmo em baixas concentrações, atuam em vários processos do desenvolvimento das plantas, interferindo na biossíntese dos hormônios vegetais (REDDY et al., 1995; LAMAS, 2001). Com isso, são capazes de afetar o crescimento e o equilíbrio entre as partes reprodutivas e vegetativas, melhorando a eficiência na distribuição dos fotoassimilados (MEREDITH JR.; WELLS, 1989; ATAHYDE; LAMAS, 1999); os mais utilizados pertencem ao grupo das auxinas e das citocininas, sendo considerados vitais às plantas, e sua interação promove o crescimento e a divisão celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para MARTINS et al. (1999), os reguladores vegetais podem influenciar bastante o crescimento da planta, alterando o tamanho dos órgãos e, conseqüentemente, o porte final, a produção de matéria seca e a produtividade.

Rademacher (2000) relatou que retardantes vegetais são para reduzir o crescimento longitudinal da parte aérea das plantas, sem reduzir a produtividade.

Esses produtos químicos sintéticos são frequentemente usados na produção de flores de vaso; atuam dentro da planta na redução da produção natural de giberelina, modificando sua morfologia e obtendo plantas pequenas. Por isso, são chamadas de antigiberelinas, interferindo na formação de células e na elongação do internódio abaixo do meristema; assim, plantas curtas são obtidas com o desenvolvimento de flores normais, com folhas menores, com coloração verde mais intensa, e os caules e hastes ficam mais compactas. Estes compostos inibem a divisão celular no meristema subapical do caule, mas têm pouco efeito na produção de folhas ou no crescimento de raízes (GIANFAGNA, 1987; BARRET, 1992).

1.2.8. Paclobutrazol

Os triazóis são inibidores de crescimento que afetam a rota dos terpenos, causando alterações no equilíbrio hormonal das plantas, afetando a produção das giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA) e citocininas (FLETCHER et al., 2000).

Um dos principais representantes da classe dos triazóis é o paclobutrazol (PBZ), que é caracterizado por apresentar estrutura em anel contendo três átomos de nitrogênio, clorofenil e cadeias laterais de carbono (FLETCHER et al., 2000).

O PBZ apresenta no interior da planta a mesma rota passiva por translocação apoplástica que a água absorvida do solo (BARRET; BARTUSKA, 1982; WATSON, 2001), com pouco movimento no floema (RICHARDSON; WEBSTER; QUINLAN, 1986), constituindo movimento acrópeto. O acúmulo do PBZ ocorre na raiz e no tecido foliar, com rápida absorção e circulação no tecido, com resultados significativos em 12 horas de tratamento (EARLY; MARTIN, 1988). Também pode ser absorvido pelas folhas, caules e raízes, sendo translocado via xilema até os meristemas subapicais de crescimento, onde irá inibir a biossíntese de giberelinas e, conseqüentemente, a elongação celular (TOMLIN, 1995).

Os triazóis inibem a biossíntese de giberelina pelo bloqueio da atividade das enzimas monooxigenases P450 no retículo endoplasmático. Essas enzimas promovem oxidação de ent-caureno a ácido ent-caurenóico e, por conseqüência, GA₁₂-aldeído, que é a primeira giberelina formada em todas as plantas, sendo a precursora de todas as outras (KENDE; ZEEVART, 1997), reduzindo o nível de divisão celular sem causar citotoxicidade (HAZARIKA, 2006).

As giberelinas são compostos terpênicos, formados de unidades isopropênicas (TAIZ; ZEIGER, 2009), constituintes de uma classe de hormônio que influencia o desenvolvimento da planta durante todo o seu ciclo de vida. Os principais sítios de biossíntese deste hormônio são tecidos vegetativos em rápido crescimento, como, sementes e frutos em desenvolvimento (KERBAUY, 2008). De acordo com Taiz e Zeiger (2009), esta substância promove incremento na divisão celular e alongamento das células.

A consequência morfológica direta da inibição da biossíntese de GA é a redução do crescimento vegetativo; os efeitos secundários refletem na alteração da força-dreno dentro da planta, ocorrendo maior partição de assimilados (LEVER, 1986).

As giberelinas são importantes no desenvolvimento dos ápices radiculares (FU; HARBERD, 2003), agindo como opositores à ação da proteínas DELLA, que inibem o alongamento celular das raízes (GUBLER et al., 2002).

O PBZ também atua na inibição da biossíntese de esterol, reduz a quantidade de ácido abscísico, etileno e ácido indol-3-acético, e aumenta a quantidade de citocininas (ARTECA, 1995). Apresenta efeitos bioquímicos como a redução de espécies reativas ao oxigênio (KRAUS; FLETCHER, 1994), aumento dos níveis de prolina (MACKAY et al., 1990) e teor de clorofila (FLETCHER; HOFSTRA, 1988).

O uso do PBZ no cultivo *in vitro* tem sido estudado como alternativa para maior sucesso na aclimatização de mudas, contribuindo para adaptação rápida e altas taxas de sobrevivência (KOZAK, 2006; THAKUR et al., 2006; GLIOZERIS; TAMOSIUNAS; STUOPYTE, 2007), principalmente por sua capacidade de retardar o crescimento das plântulas e aumentar a resistência a estresses, como o hídrico (BANON et al., 2001; BEROVA; ZLATEV; STOEVA, 2002; ZHU; VAN-DE-PEPPEL; LI; WELANDER, 2004).

Torres e Mogollón (2002) utilizaram o PBZ *in vitro* (concentrações: 0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) para verificar o desenvolvimento da *Cattleya mossiae*, e concluíram que houve redução no comprimento dos brotos e das raízes, sem afetar sua quantidade, e redução na espessura da epiderme e no comprimento da lâmina foliar.

Minea et al. (2004), verificaram que o PBZ (concentrações: 0; 0,01; 0,1 e 1 mg L⁻¹) em meio de cultivo “Vacin e Went” modificado, não apresentou resultados significativos no desenvolvimento de plântulas de orquídeas do gênero *Spathoglottis*.

Seguimentos de caule (2 a 3 cm), com 3 a 4 gemas, da orquídea *Dendrobium* sp., foram colocados em meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e quatro concentrações de PBZ (0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg L⁻¹). As concentrações de 0,025 a 0,075 mg L⁻¹ promoveram brotações em todas as gemas. A maior porcentagem de indução de gemas florais foi obtida com 0,05 mg L⁻¹. A morfologia das flores não foi afetada pelos tratamentos (TE-CHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009).

Cordeiro et al. (2010) ao suplementarem meio MS com diferentes concentrações de PBZ (0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), verificaram que o triazol promoveu

aumento no diâmetro radicular das plântulas de *Cattleya labiata*, observando maior porção de tecido cortical em detrimento ao vascular.

Ichinose (2012), ao suplementar meio de cultura MS com doses crescentes de PBZ, verificou em *Sophronitis cernua* redução do número de folhas, da área foliar, do comprimento e da massa de matéria seca da parte aérea; em contrapartida, houve incremento do diâmetro das raízes e de sua massa de matéria seca. A mesma autora estudando a orquídea *Brassavola flagellaris*, observou incremento linear no diâmetro das raízes para todas as concentrações testadas; as variáveis massa de matéria seca da parte aérea e das raízes e comprimento das raízes produziram crescimento máximo na concentração de 1 mg L^{-1} do triazol; para a área foliar e número de folhas a melhor concentração foi de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Utilizando PBZ via foliar, Wang e Hsu (1994) verificaram que a emergência das inflorescências de híbridos da orquídea *Phalaenopsis* foi progressivamente atrasada pelo aumento das concentrações de PBZ; todos os tratamentos produziram plantas com hastes mais curtas que as plantas do tratamento controle, sem afetar a qualidade visual das flores.

Estudando o efeito do PBZ em *Epidendrum radicans*, Pateli, Papafotiou e Chronopoulos (2004) verificaram que o regulador de crescimento aplicado via solo foi eficiente na redução do comprimento da haste, afetando o tamanho das folhas.

A utilização de diferentes concentrações de PBZ em meio de cultura, resultou em folhas mais grossas e menores na orquídea *Dendrobium* sp., além de uma alteração na coloração das folhas para verde mais escuro. Com relação ao caule, todas as plântulas tratadas com PBZ apresentaram internódios mais curtos e caules mais grossos, demonstrando caules mais fortes (TE-CHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009).

1.2.9. Aclimatização

O cultivo *in vitro* é realizado em frascos com baixa intensidade luminosa (1.200-3.000 lux), elevada umidade (90 a 100%), temperatura controlada ($25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$),

e meio de cultura com açúcar e nutrientes que permite o crescimento heterotrófico das plântulas. Nestas condições, as plântulas possuem folhas tenras, fotossinteticamente pouco ativas, mesofilo pouco diferenciado e sistema vascular frágil, tornando-as suscetíveis ao estresse (HAZARIKA, 2006). De acordo com Pierik (1990), a cutícula das plântulas é pouco desenvolvida, por causa da alta umidade relativa nos frascos, dificultando a adaptação na fase *ex vitro*. Os estômatos apresentam estrutura e forma alteradas, são maiores quando comparados às plantas germinadas de forma natural, com as paredes celulares das células-guardas mais finas e contendo mais amido e cloroplastos no citoplasma (MARIN; GELLA, 1988). Para Lee, Wezstein e Sommer (1985), plantas micropropagadas, por serem muito frágeis, necessitam de um período de aclimatização que as torne aptas à sobrevivência *ex vitro*.

O período de aclimatização tem por objetivo corrigir as alterações e anormalidades ocasionadas durante a fase de desenvolvimento *in vitro*. Esse período, geralmente, dura de uma a quatro semanas (SMITH; PALTA; MCCOWN, 1986), dependendo da espécie submetida à aclimatização e das técnicas utilizadas neste processo. Nesta fase, induz-se a transferência do metabolismo heterotrófico para o autotrófico por meio de alterações lentas que possibilitem à planta desenvolver maior controle sobre a perda e absorção de água. Esse processo se dá por meio do aumento gradativo na irradiância e no decréscimo controlado da umidade (PREECE; SUTTER, 1991; ROCHA, 2005).

A manutenção de alta umidade relativa do ar, seguida por sua redução gradual após o período crítico, auxilia no desenvolvimento de ceras epicuticulares e na capacidade de resposta de abertura e fechamento dos estômatos (SCIUTTI; MORINI, 1995). Brainerd e Fuchigami (1981) aumentaram a sobrevivência simplesmente abrindo as tampas dos frascos, ainda em sala de cultura, durante 4 a 5 dias antes do transplante. Esta pré-aclimatização resultou em uma adaptação mais rápida dos estômatos que em plantas diretamente transplantadas para a casa de vegetação.

Grattapaglia e Machado (1998) sugerem que, após a retirada das plantas do recipiente de micropropagação, elas sejam cobertas por polipropileno transparente com a finalidade de se criar uma câmara saturada de umidade. Ao final de cada

semana, faz-se uma abertura, em uma das extremidades do saco, de forma a incrementar as trocas de água e gases, até que se retire completamente a cobertura, promovendo, dessa forma, a progressiva rustificação das plantas.

Com relação ao incremento na irradiância, plantas cultivadas *in vitro* possuem baixo ponto de saturação de luz e, quando são transferidas para o ambiente externo, onde são expostas a níveis mais altos de irradiância, essas folhas demonstram sintomas de estresse por fotoinibição ou, mesmo, foto-oxidação (CARVALHO; AMÂNCIO, 2002). Por esses motivos, o aumento da irradiância também deve ser gradual.

No período de aclimatização, novas folhas geralmente são formadas para muitas espécies cultivadas *in vitro*, as quais possuem características intermediárias entre folhas em condições de campo e folhas com características de cultivo *in vitro*. Por apresentarem essas propriedades, elas são denominadas folhas de transição e possuem maior capacidade anatômica para transpor a passagem para a autotrófica do que as folhas formadas *in vitro* (ROCHA, 2005). A quantidade de folhas de transição depende da quantidade de gemas formadas *in vitro*.

A utilização de reguladores de crescimento em meio de cultura tem sido estudada com intuito de reduzir as perdas das plântulas na fase *ex vitro*, visto que esta fase é extremamente delicada, necessitando de estudos para reduzir estas perdas.

1.3. Referências

ABAFEP. Associação Brasileira do Agronegócio de Flores e Plantas. ABAFEP é escolhida para representar o Brasil na Euroflora. **Informativo ABAFEP**, v. 3, n. 11, 2011. Disponível em: <www.abafep.com.br/publicacao/ano3-ed11.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes E Mudas. **Floricultura do CE quer exportar US\$ 5,5 milhões**, 02 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=1208>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea**. 2004. 83p. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

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

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley, 1993. 682 p.

ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, 2002.

ARNOLD, S. V.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 233-249, 2002.

ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall, 1995. 332 p.

ATAHYDE, M. L. F.; LAMAS, F. M. Aplicação de cloreto de mepiquat no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 369-375, 1999.

BANON, S.; OCHOA, J.; FERNÁNDEZ, J. A.; FRANCO, J. A. Paclobutrazol as AIDS for *Phillyrea angustifolia* nursery production. **HortScience**, Alexandria, v. 36, p. 449-500, 2001.

BARRET, J. E. Mechanisms of action. In: Barret, J. E. **Tips on the use of chemical growth regulators on floricultural crops**. Columbus: Ohio Florists Association, 1992. p. 12-18.

BARRET, J. E.; BARTUSKA, C. A. PP333 effects dependent on site of application. **HortScience**, Alexandria, v. 17, p. 737-738, 1982.

BEROVA, M.; ZLATEV, Z.; STOEVA, N. Effect of Paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 28, n. 1-2, p. 75-84, 2002.

BLACK, P. M. **Orquídeas**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1984. 128 p.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 16, n. 4, p. 515-518, 1981.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução normativa de setembro de 2008**. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/e/a32>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. Organs and embryos. In: _____. **Plant tissue culture**. [S.l.]: Edwad Publishing, 1976. p. 3-15.

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.

CANÇADO JUNIOR, F. L.; PAIVA, B. M. de; ESTANISLAU, M. L. L. Perspectiva para exportação de flores e plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 96-102, 2005.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defense system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 1, p. 33-40, 2002.

CASTRO, C. E. F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.4, n. 1/2, p. 1-46, 1998.

CATTLEYA *schilleriana*. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cattleya_schilleriana>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CHEN, Y. F.; RANDLETT, M. D.; FINDELL, J. L.; SCHALLER, G. E. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 22, p. 19861-19866, 2002.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M. de; FONSECA, I. C. de. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n. 1, p. 145-150, 2005.

CORDEIRO, G. M.; RIGHETO, M. V. L.; BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, M. de. Avaliação anatômica e histoquímica de raízes de *Cattleya labiata* cultivadas *in vitro* na presença de paclobutazol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP - SIICUSP, 18., 2010, Piracicaba. **Anais...** Disponível em: <<https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2287&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons**. Berlin: Springer Verlag, 1985. 520 p.

DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** 2006. 130 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON, R. R. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Washington DC: IRL Press, 1985. p. 1-20.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 314 p.

EARLY, J. D. JR.; MARTIN, G. C. Sensitivity of peach seedling vegetative growth to paclobutrazol. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 23-27, 1988.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FARIA, R. T.; REGO, R. V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternative substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 337-342, 2001.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to 21st century. **Annals of Botany**, London, v. 104, n. 3, p. 359-364, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcp190>>.

FLETCHER, R. A.; HOFSTRA, G. Triazoles as potential plant protectants. In: BERG, K.; PLEMPER, M. (Ed.). **Sterol biosynthesis inhibitors: pharmaceutical and agrochemical aspects**. Cambridge: Ellis Harwood, 1988. p. 321-331.

FLETCHER, R. A.; GILLEY, A.; SANKHL, A. N.; DAVIS, T. D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.24, p. 55-138, 2000.

FU, X.; HARBERD, N. P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v. 421, n. 6924, p. 740-743, 2003.

GAMBORG, O. Plant cell cultures: nutrition and media. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 1, p. 18-26.

GIANFAGNA, Y. J. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 615-655.

GLEN, L. **Botanica's Orchids**: over 1200 species listed. Milsons Point: Laurel Glen, 2002. p. 585.

GLIOZERIS, S.; TAMOSIUNAS, A.; STUOPYTE, L. Effect of some growth regulators on chlorophyll fluorescence in *Viola x wittrockiana* 'Wesel Ice'. **Biologija**, Moscow, v. 53, n. 2, p. 24-27, 2007.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa–SPI/Embrapa-CNPq, 1998. part. 2, p.183-260.

GUBLER, F.; CHANDLER, P.; WHITE, R.; LLEWELLYN, D.; JACOBSEN, J. GA signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, n. 1, p. 191-200, 2002.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Regents/Prentice Hall, 2002. 674 p.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105–120, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>>.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura. **Produção brasileira de flores**. 2011. Disponível em: <www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=160>. Acesso em: 10 fev. 2013.

ICHINOSE, J. G. S. **Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Sophronis cernua* (Lindl.) Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. (Orchidaceae)**. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. 2010: balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Contexto & Perspectiva**: boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, p. 1-5, mar., 2011. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2010_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2012a.

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**: boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, p. 1-5, maio/jun. 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 jan. 2012b.

KENDE, H.; ZEEVART, J. A. D. The five classical plant hormones. **The Plant Cell**, Rockville v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KERBAUY, G. B.; HANDRO, W. Estudo do desenvolvimento *in vitro* de embriões de orquídeas. In: ENCONTRO NACIONAL DE ORQUIDÓFILOS E ORQUIDÓLOGOS, 1., 1980, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Editora Expressão e Cultura, 1980. p. 145-152.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 14, p. 214-217, 1946.

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.

KOZAK, D. The effect of growth retardants applied *in vitro* on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vivo*. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cults**, Lublin, v. 5, n. 1, p. 65-70, 2006. Disponível em: <<http://www.aqua.ar.wroc.pl/acta/pl/full/7/2006/000070200600005000010006500070.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012.

KRAUS, T. E.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol protects wheat seed – lings from heat and paraquat injury: is detoxification of active oxygen involved? **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 35, p. 45-52, 1994.

LAMAS, F. M. Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloreto de chlormequat aplicados no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 265-272, 2001.

LANGFORD, P. J.; WAINWRIGHT, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 60, n. 6, p. 633-640, 1987.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-culture plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, 1985.

LEE, Y. I.; CHEN, M. C.; HUANG, C. Y. Effect of medium composition on asymbiotic seed germination of five *Phalaenopsis* species. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 78, p. 225-230, 2010.

LEVER, B. G. 'Cultar' - a technical overview. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 179, p. 459-466, 1986.

MACKAY, C. E.; HALL, J. C.; HOFSTRA, G.; FLETCHER, R. A. Uniconazole induced changes in abscisic, total amino acids and proline in *Phaseolus vulgaris*. **Pestic Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 37, n. 1, p. 47-82, 1990.

MARIN, J. A.; GELLA, R. Is dessication the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p. 105-112, 1988.

MARRARA, M.; BRESCANSIN, R. B.; ZAMBOM, R. I.; GAGLIARDO, V. C.; MORAES, P. de; RAYMUNDOJÚNIOR, O. Florística da família Orchidaceae em fragmento florestal semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** p. 1-2.

MARTIN, K. P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. F.) J. D. Hook., an endangered orchid. **In vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, Totowa, v. 39, p. 322-326, 2003.

MARTINS, S. R.; FERNANDES, H. S.; ASSIS, F. N.; MENDEZ, M. E. G. Caracterização climática e manejo de ambientes protegidos: a experiência brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 200/201, p. 15-23, 1999.

MEREDITH JR., W. R.; WELLS, R. Potential for increasing cotton yields through enhanced partitioning to reproductive structures. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 3, p. 636-639, 1989.

MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do alto da serra da Mata Atlântica pluvial do sudeste do Brasil**. São Paulo: Salamandra, 1996.

MINEA, M.; PILUEK, C.; MENAKANIT, A.; TANTIWIWAT, S. A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis* orchids. **Kasetsart Journal Natural Science**, Bangkok, v. 38, p. 141-156. 2004.

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

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, 1975. v. 1.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, 1977. v. 2.

PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G. de; RODRIGUES, V. A.; OLIVEIRA, A. C. de. Cultivo de orquídeas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 85-94, 2005.

PATELI, P.; PAPAFOOTIU, M.; CHRONOPOULOS, J. Comparative effects of four plant growth retardants on growth of *Epidendrum radicans*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 2, p. 303-307, 2004.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 63 p.

PELÚZIO, L. E.; SOARES, M. N. Orquídeas: porta aberta para a educação ambiental. **Revista Ponto de Vista**, v. 1, n. 1, p. 55-63, 2004.

PIVETTA, K. F. L.; YANAGISAWA, S. S.; FARIA, R. T.; MATTIUZ, C. F. M.; TAKANE, R. J.; BATISTA, G. S.; GIMENES, R.; ICHINOSE, J. G. S. Orquídeas. In: ALMEIDA, E. F. A.; PAIVA, P. D. O.; LANDGRAF, P. R. C. **Flores de corte**. Lavras: UFLA, 2013. no prelo.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**,

Palo Alto, v. 51, p. 501-531, 2000. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REDDY, K. R.; BOONE, M. R.; REDDY, A. R.; HODGES, H. F.; TURNER, S. B.; MCKINION, J. M. Developing and validating a model for plant growth regulator. **Agronomy Journal**, Madison, v. 8, n. 6, p. 1100-1105, 1995.

RICHARDSON, P. J.; WEBSTER, A. D.; QUINLAN, J. D. The effect of paclobutrazol sprays with or without the addition of surfactants on the shoot growth, yield and fruit quality of the apple cultivars Cox and Suntan. **Journal of Horticultural Science**, Reading, v. 61, p. 439-446, 1986.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, London, v. 18, n. 8, p. 325-329, 2008.

ROBERTS, A. V.; WALKER, S.; HORAN, I.; SMITH, E. F.; MOTTLEY, J. The effect of growth retardants, humidity and lighting at Stage III on Stage IV of micropropagation in chrysanthemum and rose. **Acta Horticulturae**. The Hague, n. 319, p. 153-158, 1992.

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

SALOMÉ, J. R. **Mercado brasileiro de plantas ornamentais**. 2007. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=511>. Acesso em: 10 nov. 2011.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n. 2, p. 221-228, 1995.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídeas *Brassiocattleya Pastoral* X *Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 73 p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SMITH, M. A. L.; PALTA, J. P.; MCCOWN, B. H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling and greenhouse-grown Asian white birch. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 3, p. 437-442, 1986.

SMITH, E. F.; ROBERTS, A. V.; MOTTLEY, J. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 21, p. 133-140, 1990.

SMITH, E. F.; GRIBAUDO, I.; ROBERTS, A. V.; MOTTLEY, J. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 111-113, 1992.

SOBHANA, A.; RAJEEVAN, P. K. Refinement of embryo culture medium in *Dendrobium*. Floriculture Research Trend in India In: THE NATIONAL SYMPOSIUM ON INDIAN FLORICULTURE IN THE NEW MILLENNIUM, 2002, New Delhi. **Proceedings...** p. 134-138.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n. esp., p. 1532-1538, 2003. Disponível em: <http://www.cloud.editora.ufla.br/revistas/cienagro/pdf/27-E-2003_11.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 571-576.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S. **Cultivo moderno de orquídeas: Phalaenopsis**. São Paulo: Ed. Cantareira, 2007. 130 p.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza-CE, 2010. p. 17-25.

TE-CHATO, S.; NUJEEN, P.; MUANGSORN, S. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Frederick's *Dendrobium* orchid *in vitro* **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 157-165, 2009. Disponível em: <http://www.ijat-aatsea.com/pdf/june_v5_n1_09/14-14-ijat2008_45f.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P. K.; PANDEY, S.; SOBTI, R. C.; AHUJA, P. S. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 25, n. 5, p. 382–391, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-005-0094-1>>.

TOMLIN, C. **The pesticide manual handboock**. 10 ed. Hampshire: British Crop Protection Council, 1995. 1341 p.

TORRES, J.; MOGOLLÓN, N. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previo a la aclimatización. **Bioagro**, Barquisimeto, n. 14, p. 25-28, 2002. Disponível em: <[www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14\(1\)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14(1)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf)>. Acesso em: 3 dez. 2012.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchids seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 111, p. 175-183, 1949.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B.; RIBEIRO, R. C. L. F. Changes in soluble carbohydrate and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 105-111, 1998.

WANG, Y. T.; HSU, T. Y. Flowering and growth of *Phalaenopsis* orchids following growth retardant applications. **Hort Science**, Alexandria, v. 29, n. 4, p. 285-288, 1994.

WATSON, G. W. Soil-applied paclobutrazol affects root growth, shoot growth and water potential of American elm seedlings. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, v. 19, p. 119-122, 2001.

WHITE, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, Cambridge, v. 2, p. 231-244, 1951.

YANG, L.; GAO, S.; ZOU, Z.; CHEN, G. Primary studies on polyploidy induction of *Cymbidium* hybrid *in vitro*. **Northern Horticulture**, Pequim, v. 6, p. 6, 2009.

ZHU, L. H.; VAN-DE-PEPPEL, A.; LI, X. Y.; WELANDER, M. Changes of leaf water potential and endogenous cytokinins in young apple trees treated with or without

paclobutrazol under drought conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 133-141, 2004.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Cauliflower shoot culture: effects of types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, Clare, v. 141, n. 2, p. 209-217, 1999.

CAPÍTULO 2 – Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de *Zygopetalum crinitum* Lodd. durante as fases *in vitro* e de aclimatização

RESUMO – A espécie *Zygopetalum crinitum* Lodd. é uma orquídea terrestre nativa do Brasil, com potencial ornamental. Como não há informações na literatura, faz-se necessário desenvolver e aprimorar técnicas para a propagação desta espécie, a fim de disponibilizar mudas e incentivar o seu mercado. 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*). Em razão disto, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da suplementação do meio de cultura Murashige e Skoog com paclobutrazol, no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de plantas de *Zygopetalum crinitum*, visando aumentar a taxa de sobrevivência *ex vitro*. O delineamento experimental (*in vitro* e *ex vitro*) foi inteiramente casualizado. Foram quatro tratamentos (três concentrações de paclobutrazol: 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹ e controle); na fase *in vitro*, foram 5 repetições com 5 plântulas/parcela e na fase *ex vitro*, 5 repetições com 15 plântulas/parcela. A suplementação do meio de cultivo com PBZ promoveu em plântulas de *Z. crinitum* redução no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, e engrossamento das raízes durante a fase *in vitro*; na fase *ex-vitro*, verificou-se engrossamento das raízes, redução no comprimento e na massa de matéria seca da parte aérea. As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de PBZ não implicaram melhores taxas de sobrevivência desta orquídea.

2.1. Introdução

O Brasil dispõe de grande diversidade de espécies da família Orchidaceae, representada por cerca de 200 gêneros e aproximadamente 2.350 espécies. As

orquídeas destacam-se como importante planta ornamental, de interesse econômico, botânico, medicinal, cosmético e alimentício (ARAÚJO, 2004).

O gênero *Zygopetalum* possui aproximadamente vinte espécies de orquídeas, dentre epífitas e terrestres, nativas da América do Sul, que ocorrem em Floresta Tropical, afloramentos rochosos e serapilheira. As flores são perfumadas e geralmente coloridas, e a inflorescência surge do outono à primavera (BRICKELL, 1996).

Considerando a dificuldade de multiplicação sexuada das orquídeas de forma natural, devida à dependência de fungos simbióticos, faz-se necessária a germinação *in vitro*.

No cultivo *in vitro*, os meios de cultura devem oferecer condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BUTCHER; INGRAN, 1976; DIXON, 1985), e o uso adequado de reguladores de crescimento nas diferentes fases do processo é essencial (SOUZA et al., 2003).

A aclimatização é a transferência das plantas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (casa de vegetação), controlando fatores como temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; COSTA, 1998). Durante esse processo, ocorre a conversão da condição heterotrófica para autotrófica e um retorno às características naturais da planta (DÍAZ-PÉREZ; SHACKEL; SUTTER, 1995). A aclimatização tem como objetivo, minimizar as dificuldades as quais as plantas são submetidas durante a transferência para a casa de vegetação (DEBERG; ZIMMERMAN, 1991; SOUZA et al., 2007).

Os retardadores de crescimento vegetal têm sido relatados como agentes eficazes na redução do tamanho das plantas, proporcionando folhas verde-escuras e raízes grossas, o que as define como mudas saudáveis; permitem também redução na perda de água, levando a melhores sobrevivência e crescimento em condições *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; KOZAK, 2006; THAKUR et al., 2006).

O paclobutrazol (PBZ) é um retardante de crescimento de plantas de amplo espectro, com grande potencial de utilização (TONGUMPAI, 1991), que induz tolerância leve ao estresse em plântulas e plantas adultas (FLETCHER et al., 2000). Este triazol promove a inibição da biossíntese das giberelinas (SILVA, 2000) pela

inibição da oxidação de caurene para ácido carenóico, reduzindo o nível de divisão celular sem causar toxicidade às células (DAZIEL; LAWRENCE, 1984).

O modo de ação do PBZ está associado ao decréscimo na transpiração, altura da planta, biomassa e área foliar, e incremento à resistência estomática (TECHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009), características que podem favorecer melhores condições adaptativas das plantas ao ambiente *ex vitro* (ICHINOSE, 2012).

Como a orquídea *Z. crinitum* é pouco estudada e apresenta potencial comercial, verifica-se a necessidade de aprimorar técnicas *in vitro* e *ex vitro*, visando disponibilizar mudas em grande quantidade e de alta qualidade. Este trabalho objetivou avaliar a eficiência do PBZ no crescimento e desenvolvimento de *Zygopetalum crinitum* durante as fases *in vitro* e de aclimatização.

2.2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas Ornamentais e na Casa de Vegetação de Plantas Ornamentais do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Unesp/FCAV, em Jaboticabal, São Paulo, no período de agosto de 2012 à fevereiro de 2013.

Tanto para a fase *in vitro* como *ex vitro*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e foram quatro tratamentos (três concentrações de paclobutrazol - PBZ: 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹ e o tratamento isento de PBZ) e cinco repetições. Inicialmente, foram arranjados, para cada tratamento, 25 frascos com cinco plântulas cada um. Na avaliação da fase *in vitro*, considerou-se cada repetição representada por um frasco contendo cinco plântulas (5 frascos/tratamento), e para a fase *ex vitro*, foram três frascos por repetição, totalizando 15 plântulas por parcela (15 frascos/tratamento). Os cinco frascos excedentes, por tratamento, foram colocados por garantia no caso de contaminação.

Sementes de *Z. crinitum* foram semeadas em meio de cultura MS, previamente autoclavado (121 °C, 1 atm, durante 15 minutos), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Os frascos de vidro com as sementes foram mantidos em sala de crescimento por seis meses, em intensidade luminosa incidente de 40 μmol m⁻² s⁻¹, utilizando lâmpadas fluorescentes de 20 w, fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 ± 2,0 °C.

Plântulas de *Z. crinitum*, com 1,5 ± 0,2 cm de comprimento de parte aérea, foram selecionadas para os tratamentos. O meio de cultura MS foi renovado a cada 30 dias, contendo as devidas concentrações de PBZ, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. As plântulas foram mantidas nos tratamentos por três meses em intensidade luminosa incidente de 40 μmol m⁻² s⁻¹, utilizando lâmpadas fluorescentes de 20 w, fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 ± 2,0 °C.

Após três meses, foram separadas cinco plântulas por parcela para análises destrutivas e quinze plântulas por parcela para aclimatização.

Durante a aclimatização, os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação coberta (topo e laterais) por filme de polietileno (150 micra) e tela preta com retenção de 70% da luminosidade. Foram utilizadas bandejas de plástico com 98 células (3,5 cm x 3,5 cm x 5 cm) com furos na superfície inferior. Como substrato, utilizou-se o esfagno, previamente autoclavado. A reposição de água foi realizada diariamente, mantendo 100% da capacidade de retenção de água do substrato, visto que, nesta fase, é necessária alta umidade. As mudas foram avaliadas 60 dias após o transplante.

A temperatura e a umidade relativa na casa de vegetação foram monitoradas diariamente. As médias das temperaturas no período de aclimatização foram de 21,4 °C, 26,7 °C e 32,7 °C para a temperatura mínima, média e máxima, respectivamente; a umidade relativa média no mesmo período foi de 63,4%.

As características avaliadas tanto *in vitro* quanto *ex vitro* foram: área foliar (Li-Cor, modelo L1-3100[®]); número e comprimento das raízes e das folhas; diâmetro das raízes (paquímetro digital Digimess[®]); massa de matéria seca da parte aérea e da raiz (estufa de circulação forçada de ar a 70 °C). Os dados de número de folhas e de raízes foram transformados em $(x + 1)^{1/2}$.

Foi realizada análise de regressão polinomial a fim de verificar o comportamento das variáveis em função do aumento da concentração de PBZ.

No experimento *ex vitro*, foi avaliada, ainda, a taxa de sobrevivência aos 15, 30, 45 e 60 dias após o transplante, cujos dados foram transformados em $\arcsin(x/100)^{1/2}$.

2.3. Resultados e Discussão

No experimento *in vitro*, verificou-se que o comprimento da parte aérea (Figura 3) e das raízes (Figura 4) diminuiu com o aumento das concentrações de PBZ, sendo que na concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, a parte aérea reduziu 44,6% e as raízes, 33,8% em relação ao tratamento controle (ausência de PBZ).

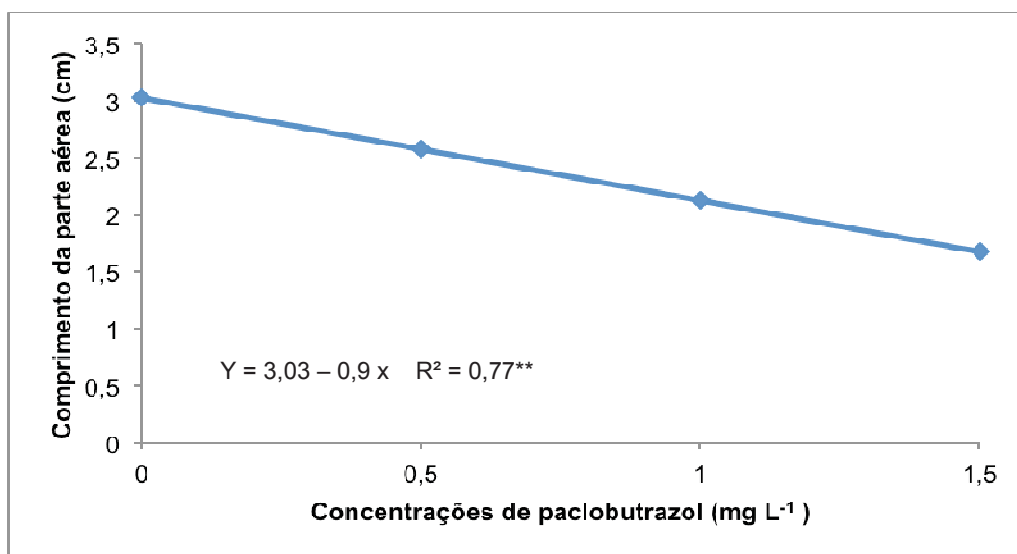


Figura 3. Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

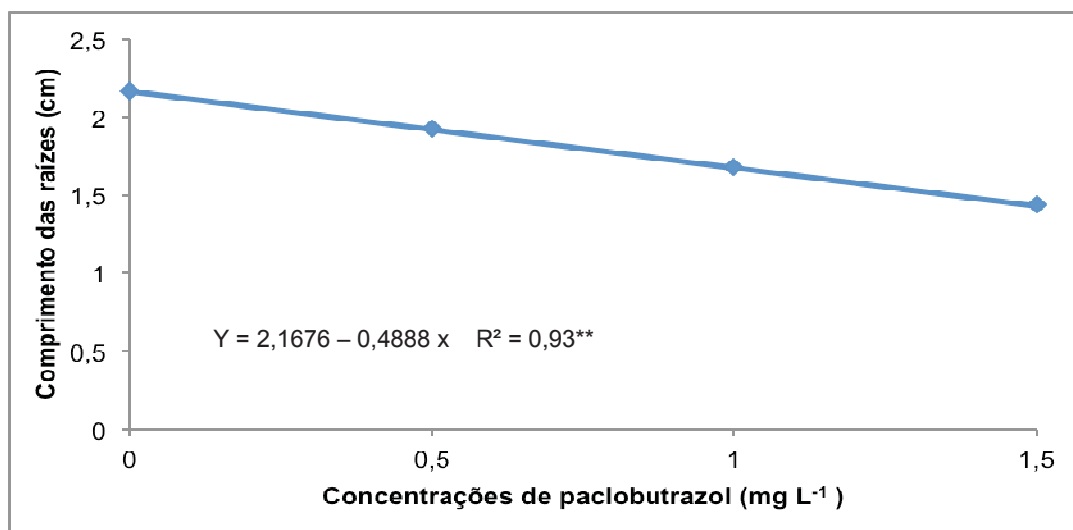


Figura 4. Comprimento das raízes (cm) de plântulas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

Este menor comprimento da parte aérea observado nas plântulas de *Z. crinitum* tratadas com PBZ pode ser explicado pela inibição da biosíntese de giberelina, como comenta Kerbaui (2008), pois a consequência morfológica direta da inibição da biossíntese de GA é a redução do crescimento vegetativo (LEVER, 1986). Resultados semelhantes foram verificados para outras orquídeas igualmente cultivadas *in vitro* e submetidas a diferentes concentrações crescentes de PBZ, como *Cattleya mossiae* (TORRES; MOGOLLÓN, 2002), *Dendrobium* sp. (TECHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009), *C. labiata* (RIGHETO, 2011), *Sophranitis cernua* e *Brassavola flagellaris* (ICHINOSE, 2012).

O aumento das concentrações do triazol promoveu um acréscimo no diâmetro das raízes das plântulas de *Z. crinitum* (Figura 5) de 51,9% em relação ao tratamento controle.

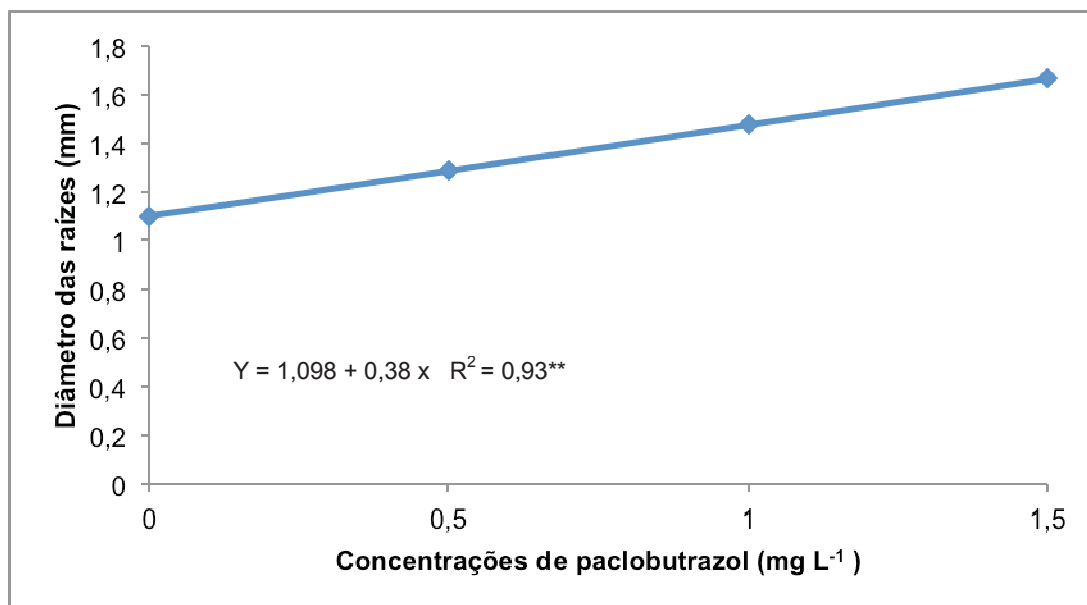


Figura 5. Diâmetro das raízes (mm) de plântulas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

O intuito principal do uso do PBZ é justamente o engrossamento das raízes, favorecendo o processo de aclimatização das mudas, conforme explicam Canto et al. (2004), e este maior diâmetro tem sido observado também nos estudos com outras orquídeas como *Dendrobium* sp. (TE-CHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009), *Cattleya labiata* (CORDEIRO et al., 2010), *Sophranitis cernua* e *Brassavola flagellaris* (ICHINOSE, 2012).

Cordeiro et al. (2010) demonstraram o efeito positivo do engrossamento das raízes, com uso do PBZ, na aclimatização, e verificaram nas raízes de plântulas de *Cattleya labiata*, cultivadas *in vitro*, maior porção de tecido cortical em detrimento ao vascular.

Na figura 6, pode-se observar uma muda que não foi tratada com PBZ, apresentando raízes mais longas e finas e folhas mais desenvolvidas, quando comparada com uma muda tratada com 1,5 mg L⁻¹ de PBZ.

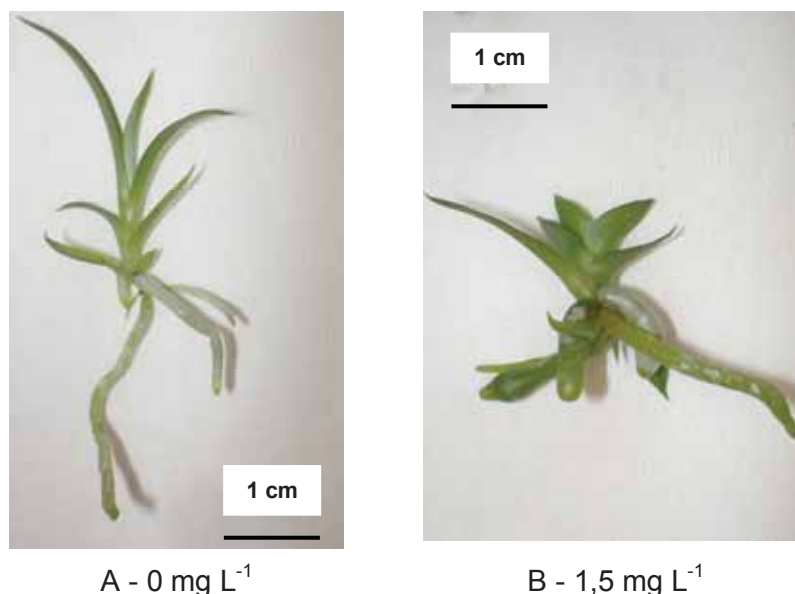


Figura 6. Mudanças de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS sem adição de paclobutrazol (A) e suplementado (B) com 1,5 mg L⁻¹ de PBZ.

Não houve ajuste de regressão para área foliar, número de raízes, massa de matéria seca da parte aérea e da raiz durante o cultivo *in vitro*.

Os resultados obtidos na fase *in vitro* mantiveram-se durante a aclimatização, exceto para o comprimento de raízes; verificou-se um decréscimo no comprimento da parte aérea (Figura 7); houve redução de 49,7% do tratamento controle para o tratamento de maior concentração de PBZ.

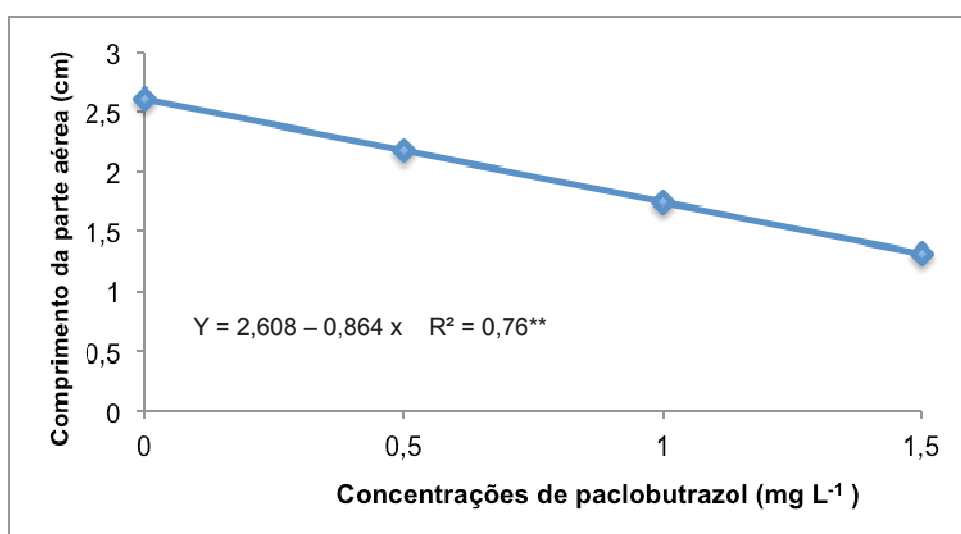


Figura 7. Comprimento da parte aérea (cm) de mudas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 60 dias de aclimatização.

O aumento das concentrações de PBZ no meio de cultura proporcionou aumento linear no diâmetro das raízes (Figura 8) durante a aclimatização.

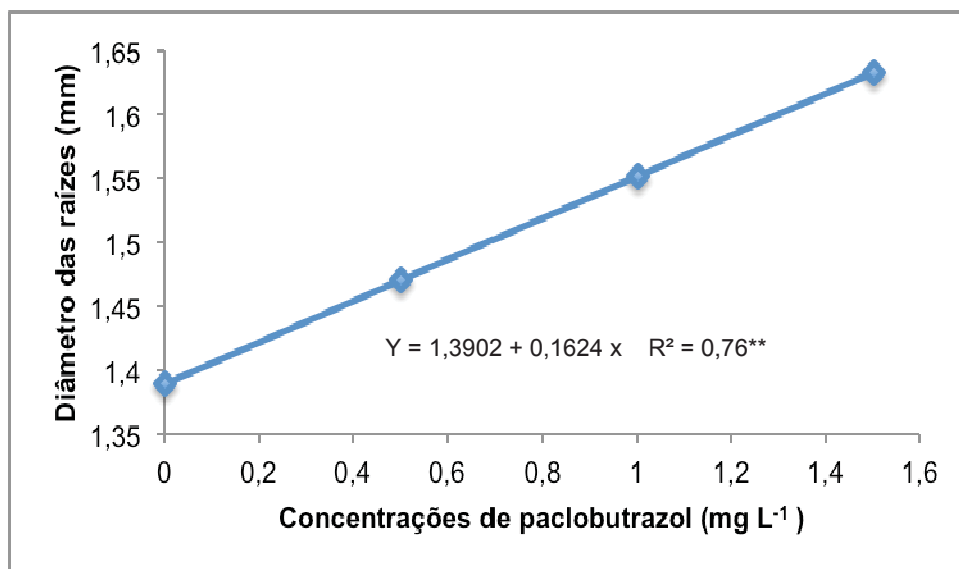


Figura 8. Diâmetro das raízes (mm) de mudas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 60 dias de aclimatização.

A massa de matéria seca da parte aérea (Figura 9) em casa de vegetação mostrou-se superior na ausência de PBZ, sendo 44,39% maior no tratamento controle que na concentração máxima do retardante de crescimento. Este resultado acompanha a diminuição do comprimento da parte aérea que, não foi verificado no cultivo *in vitro*, porém, verificado na aclimatização. Resultados semelhantes foram observados também por Ichinose (2012) para a orquídea *Sophranitis cernua*.

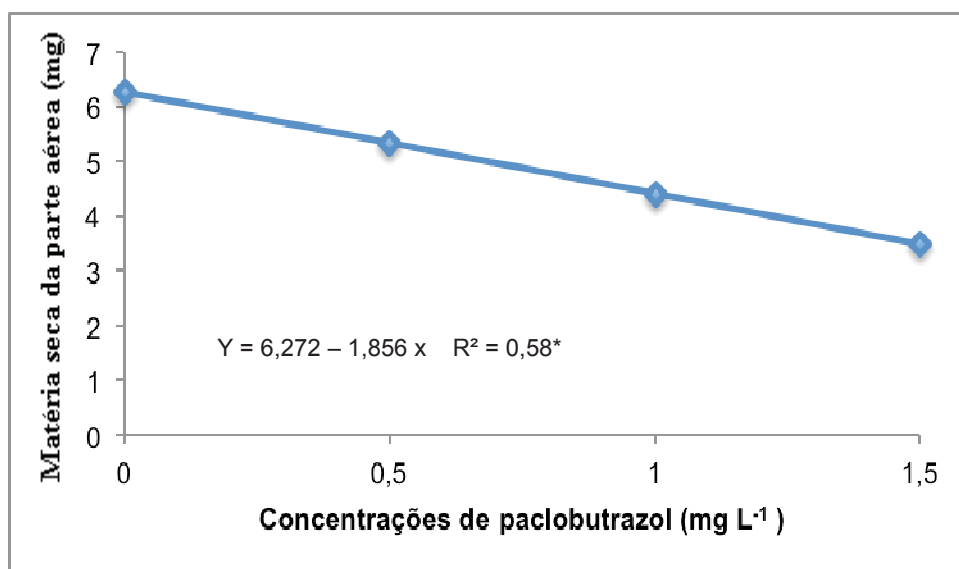


Figura 9. Massa de matéria seca da parte aérea (mg) de mudas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 60 dias de aclimatização.

Não houve ajuste de regressão na aclimatização para a variável área foliar, número de folhas, número e comprimento das raízes e massa de matéria seca da raiz durante o cultivo *ex vitro*.

A taxa de sobrevivência (Figura 10) com o uso do PBZ foi inferior em relação ao tratamento controle aos 45 e 60 dias após o transplante, sendo que, em ambas as avaliações, a sobrevivência das mudas foi menor que 50% na maior concentração testada (1,5 mg L⁻¹). Não houve ajuste de regressão aos 15 e 30 dias após o transplante.

Há relatos de rápida adaptação e elevada porcentagem de sobrevivência na aclimatização de plantas, provenientes do cultivo *in vitro*, utilizando PBZ (KOZAK, 2006; THAKUR et al., 2006). No entanto, o sucesso obtido por outros pesquisadores na aclimatização das plantas com o uso de PBZ não foi verificado neste ensaio e também para outras orquídeas como *Sophranitis cernua* e *Brassavola flagellaris* (ICHINOSE, 2012).

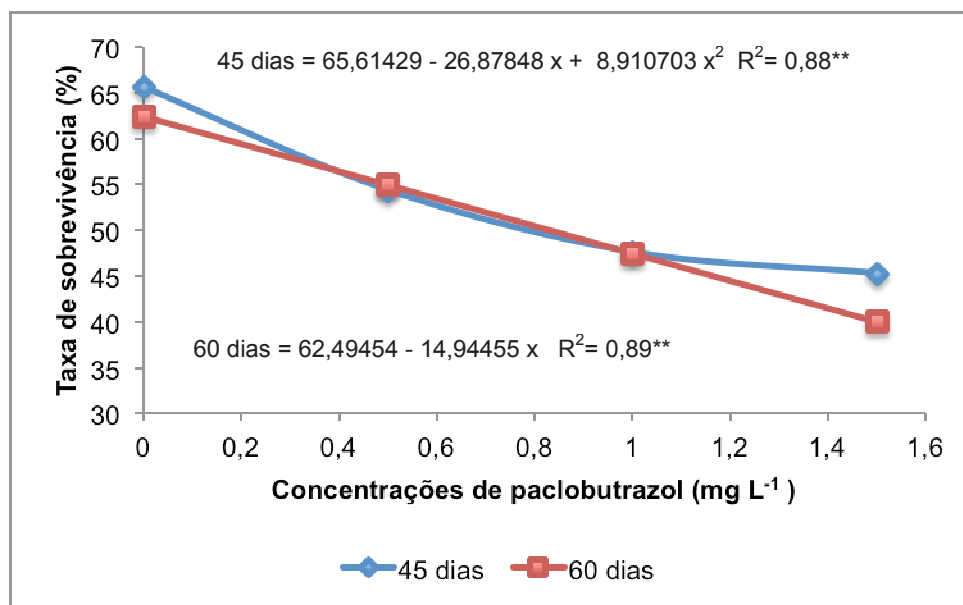


Figura 10. Taxa de sobrevivência de mudas de *Zygopetalum crinitum* Lodd. após 45 e 60 dias de aclimatização.

Estes resultados podem indicar que a concentração utilizada pode não ter sido adequada para promover as alterações necessárias nas plântulas para que estas tivessem maior resistência às condições de cultivo *ex vitro*.

2.4. Conclusão

A suplementação do meio de cultivo com paclobutrazol reduziu o comprimento da parte aérea e das raízes, e promoveu um engrossamento das raízes.

Na aclimatização, verificou-se engrossamento das raízes, redução no comprimento e na massa de matéria seca da parte aérea.

As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de paclobutrazol não implicaram melhores taxas de sobrevivência da orquídea *Zygopetalum crinitum*.

2.5. Referências

ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de orquídea**. 2004. 83p. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

BRICKELL, C. **The Royal Horticultural Society: a-z encyclopedia of garden plants**. London: Dorling Kindersley, 1996. p. 1071.

BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. Organs and embryos. In: _____. **Plant tissue culture**. [S.l.]: Edwad Publishing, 1976. p. 3-15.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CORDEIRO, G. M.; RIGHETO, M. V. L.; BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, M. de. Avaliação anatômica e histoquímica de raízes de *Cattleya labiata* cultivadas *in vitro* na presença de paclobutazol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP - SIICUSP, 18., 2010, Piracicaba. **Anais...** Disponível em: <<https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2287&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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

DAZIEL, J.; LAWRENCE, D. K. Biochemical and biological effects of kaurene oxidase inhibitors, such as paclobutrazol. **British Plant Growth Regulators Group Monographs**, Bristol, v.4, p.1-14, 1984.

DEBERG, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 484 p.

DÍAZ-PÉREZ, J., SHACKEL, K. A.; SUTTER, G. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 9, p. 225-232, 1995.

DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON, R. R. (Ed.). **Plant cell culture: a pratical approach**. Washington DC: IRL Press, 1985. p. 1-20.

FLETCHER, R. A.; GILLEY, A.; SANKHL, A. N.; DAVIS, T. D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.24, p. 55–138, 2000.

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

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105–120, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>>.

ICHINOSE, J. G. S. **Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Sophronitis cernua* (Lindl.) Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. (Orchidaceae)**. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KOZAK, D. The effect of growth retardants applied in vitro on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vivo*. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cults**, Lublin, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2006. Disponível em: <<http://www.aqua.ar.wroc.pl/acta/pl/full/7/2006/000070200600005000010006500070.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012.

LEVER, B. G. ‘Cultar’ - a technical overview. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 179, p. 459-466, 1986.

RIGHETO, M. V. L. **Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol.** 2011. 84 p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.

SILVA, L. M. G. **Doses e métodos de aplicação do paclobutrazol em mangueiras cv. Tommy Atkins.** 2000. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Administração, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2000.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n. esp., p. 1532-1538, 2003. Disponível em: <http://www.cloud.editora.ufla.br/revistas/cienagro/pdf/27-E-2003_11.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

SOUZA, J. A. de; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; SOARES, G. C. Estabelecimento da Propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 115-118, 2007. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v13n1/artigo18.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

TE-CHATO, S.; NUJEEN, P.; MUANGSORN, S. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's *Dendrobium* orchid *in vitro* **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 157-165, 2009. Disponível em: <http://www.ijat-aatsea.com/pdf/june_v5_n1_09/14-14-ijat2008_45f.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P. K.; PANDEY, S.; SOBTI, R. C.; AHUJA, P. S. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 25, n. 5, p. 382–391, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-005-0094-1>>.

TONGUMPAI, P. **Flower induction of mango.** Kasetsart: University of Thailand, 1991. (Extension Bulletin,19).

TORRES, J.; MOGOLLÓN, N. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previo a la aclimatización. **Bioagro**, Barquisimeto, n. 14, p. 25-28, 2002. Disponível em: <[www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14\(1\)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14(1)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf)>. Acesso em: 3 dez. 2012.

CAPÍTULO 3 – Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento de *Cattleya schilleriana* Rchb.f. durante as fases *in vitro* e de aclimatização

RESUMO – A orquídea *Cattleya schilleriana* é uma espécie brasileira extinta em seu habitat, em consequência da coleta predatória e da derrubada de matas para ampliação de fronteiras agrícolas. O domínio de técnicas para a domesticação e propagação em massa das espécies em extinção é extremamente importante, visto que diminuiria 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*). Em razão disto, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da suplementação do meio de cultura Murashige e Skoog com paclobutrazol, no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de plantas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f., visando aumentar a taxa de sobrevivência *ex vitro*. O delineamento experimental (*in vitro* e *ex vitro*) foi inteiramente casualizado. Foram quatro tratamentos (três concentrações de paclobutrazol: 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹ de ingrediente ativo e controle); na fase *in vitro*, foram 5 repetições com 5 plântulas/parcela e na fase *ex vitro*, 5 repetições com 15 plântulas/parcela. A aplicação do PBZ em meio de cultura promoveu engrossamento das raízes durante a fase *in vitro*; na aclimatização, verificou-se engrossamento das raízes e redução no comprimento da parte aérea. As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de PBZ implicaram melhores taxas de sobrevivência da orquídea *C. schilleriana*.

3.1. Introdução

O gênero *Cattleya* é originário da América Tropical e Subtropical, entre México e Brasil; engloba cerca de 70 espécies e inúmeros híbridos naturais. As orquídeas desse gênero são todas epífitas e de crescimento simpodial, as flores

apresentam três sépalas e três pétalas (sendo uma delas modificada – labelo) bem definidas (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010).

As espécies de orquídeas tropicais possuem muitos indivíduos em vias de extinção, havendo, portanto, necessidade urgente de retirá-las desta condição (FARIA et al., 2001). Segundo a última listagem divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente, há 34 espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008). Atribui-se esta diminuição à coleta predatória e ao aumento das fronteiras agrícolas, que retiram a floresta, seu hábitat natural, para pecuária ou cultivos agrícolas (COLOMBO et al., 2005). A espécie *C. schilleriana* foi incluída pelo Ministério do Meio Ambiente na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008).

O domínio de técnicas para o cultivo *in vitro* é fundamental para a domesticação e propagação em massa de orquídeas, reduzindo o custo de produção e, conseqüentemente, diminuindo a coleta predatória nas matas, sendo uma forma de conservar as nativas em seu habitat.

Considerando a dificuldade de multiplicação sexuada das orquídeas de forma natural, devida à dependência de fungos simbióticos, faz-se necessária a germinação *in vitro*.

No cultivo *in vitro*, os meios de cultura devem oferecer condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BUTCHER; INGRAN, 1976; DIXON, 1985), e o uso de reguladores de crescimento são essenciais para realização deste cultivo (SOUZA et al., 2003).

A aclimatização é a transferência das plantas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (casa de vegetação) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; COSTA, 1998). As plantas, ao serem transferidas para a etapa *ex vitro*, passam por uma fase de adaptação climática extremamente delicada, principalmente em decorrência dos fatores de luminosidade, taxa de fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade, além da passagem da condição heterotrófica para autotrófica e um retorno às características naturais da planta (DÍAZ-PÉREZ; SHACKEL; SUTTER, 1995). A aclimatização tem como objetivo, minimizar as dificuldades as quais as plantas são submetidas durante a transferência para a casa de vegetação (DEBERG; ZIMMERMAN, 1991; SOUZA et al., 2007).

O paclobutrazol (PBZ) é um retardante de crescimento de plantas de amplo espectro, com grande potencial de utilização (TONGUMPAI, 1991), que induz tolerância leve ao estresse em plântulas e plantas adultas (FLETCHER et al., 2000). Este triazol promove a inibição da biossíntese das giberelinas (SILVA, 2000) pela inibição da oxidação de caurene para ácido carenólico, reduzindo o nível de divisão celular sem causar toxicidade às células (DAZIEL; LAWRENCE, 1984).

O modo de ação do PBZ está associado ao decréscimo na transpiração, altura da planta, biomassa e área foliar, e incremento à resistência estomática (TECHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009), características que podem favorecer melhores condições adaptativas das plantas ao ambiente *ex vitro* (ICHINOSE, 2012).

Como a orquídea *C. schilleriana* está em vias de extinção e apresenta potencial comercial, verifica-se a necessidade de aprimorar técnicas *in vitro* e *ex vitro*, visando disponibilizar mudas em grande quantidade e de alta qualidade, reduzindo a coleta predatória e, futuramente, retirando esta espécie da lista de plantas ameaçadas de extinção. Este trabalho objetivou avaliar a eficiência do PBZ no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de plantas de *Cattleya schilleriana*, visando a manutenção da espécie.

3.2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas Ornamentais e na Casa de Vegetação de Plantas Ornamentais do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Unesp/FCAV, em Jaboticabal, São Paulo, no período de agosto de 2012 à fevereiro de 2013.

Tanto para a fase *in vitro* como *ex vitro*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e foram quatro tratamentos (três concentrações de paclobutrazol - PBZ: 0,5; 1,0; 1,5 mg L⁻¹ e o tratamento isento de PBZ) e cinco repetições. Inicialmente, foram arranjados, para cada tratamento, 25 frascos com

cinco plântulas cada um. Na avaliação da fase *in vitro*, considerou-se cada repetição representada por um frasco contendo cinco plântulas (5 frascos/tratamento) e para a fase *ex vitro*, foram três frascos por repetição, totalizando 15 plântulas por parcela (15 frascos/tratamento). Os cinco frascos excedentes, por tratamento, foram colocados por garantia no caso de contaminação.

Sementes de *C. schilleriana* foram semeadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) previamente autoclavado (121 °C, 1 atm, durante 15 minutos), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Os frascos de vidro com as sementes foram mantidos em sala de crescimento por doze meses, em intensidade luminosa incidente de 40 µmol m⁻² s⁻¹, utilizando lâmpadas fluorescentes de 20 w, fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 ± 2,0 °C.

Plântulas de *C. schilleriana*, com 1,5 ± 0,2 cm de comprimento de parte aérea, foram selecionadas para os tratamentos. O meio de cultura MS foi renovado a cada 30 dias durante três meses, contendo as devidas concentrações de PBZ, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de Agar e pH ajustado para 5,8. As plântulas foram mantidas nos tratamentos por três meses em intensidade luminosa incidente de 40 µmol m⁻² s⁻¹, utilizando lâmpadas fluorescentes de 20 w, fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 ± 2,0 °C.

Após três meses, foram separadas cinco plântulas por parcela para análises destrutivas e quinze plântulas por parcela para aclimatização.

Durante a aclimatização, os tratamentos foram mantidos em casa de vegetação coberta e revestida nas laterais com tela preta com retenção de 70% da luminosidade. Utilizaram-se bandejas de plástico com 98 células (3,5 cm x 3,5 cm x 5 cm) com furos na superfície inferior. Como substrato, utilizou-se o esfagno, previamente autoclavado. A reposição de água foi realizada diariamente, mantendo 100% da capacidade de retenção de água do substrato, visto que, nesta fase, é necessária alta umidade. As mudas foram avaliadas 60 dias após o transplante.

A temperatura e a umidade relativa na casa de vegetação foram monitoradas diariamente. As médias das temperaturas no período de aclimatização foram de 21,4 °C, 26,7 °C e 32,7 °C para a temperatura mínima, média e máxima, respectivamente; a umidade relativa média no mesmo período foi de 63,4%.

As características avaliadas tanto *in vitro* quanto *ex vitro* foram: área foliar (Li-Cor, modelo L1-3100[®]); número e comprimento das raízes e das folhas; diâmetro das raízes (paquímetro digital Digimess[®]); massa de matéria seca da parte aérea e da raiz (estufa de circulação forçada de ar a 70 °C). Os dados de número de folhas e de raízes foram transformados em $(x + 1)^{1/2}$.

Foi realizada análise de regressão polinomial a fim de verificar o comportamento das variáveis em função do aumento da concentração de PBZ.

No experimento *ex vitro*, foi avaliada, ainda, a taxa de sobrevivência aos 15, 30, 45 e 60 dias após o transplante, cujos dados foram transformados em $\arcsin(x/100)^{1/2}$.

3.3. Resultados e Discussão

No experimento *in vitro*, verificou-se que o diâmetro das raízes (Figura 11) teve acréscimo com o aumento das concentrações de PBZ, sendo que na concentração de 1,5 mg L⁻¹, as raízes aumentaram 69,46% em relação ao tratamento controle (ausência de PBZ).

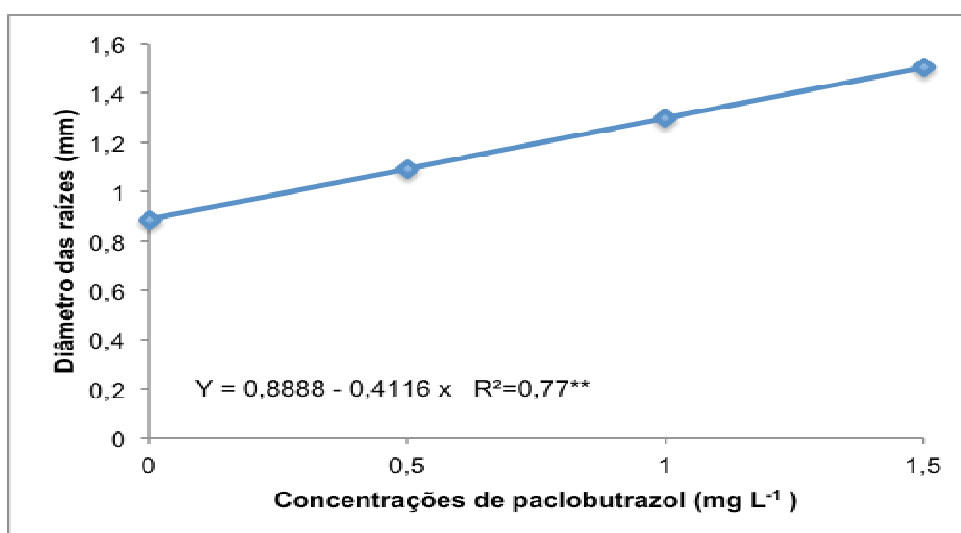


Figura 11. Diâmetro das raízes (cm) de plântulas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f. após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

Este engrossamento das raízes é um dos efeitos esperados com o uso do PBZ, pois favorece o processo de aclimatização das mudas, conforme explicam Canto et al. (2004), e este maior diâmetro tem sido observado também nos estudos com outras orquídeas como *Dendrobium* sp. (TE-CHATO; NUJEEN; MUANGSORN, 2009), *Cattleya labiata* (CORDEIRO et al., 2010), *Sophranitis cernua* e *Brassavola flagellaris* (ICHINOSE, 2012).

Em plântulas de *Cattleya labiata* submetidas a diferentes concentrações de PBZ, verificou-se incremento no diâmetro das raízes, observando-se maior porção do tecido cortical em detrimento ao vascular, o que representa uma característica positiva para a aclimatização (CORDEIRO et al., 2010).

Não houve ajuste de regressão para a variável área foliar, número e comprimento das raízes e das folhas, massa de matéria seca da parte aérea e da raiz durante o cultivo *in vitro*.

Após aclimatização, para variável comprimento da parte aérea, houve ajuste de regressão linear negativa em que se observa um decréscimo de 71,88% em relação ao tratamento controle (Figura 12).

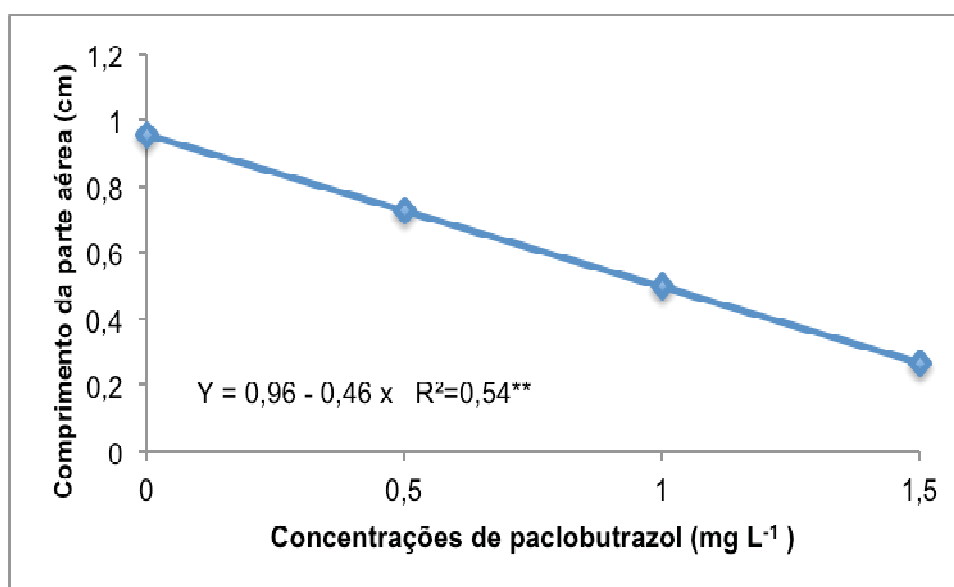


Figura 12. Comprimento da parte aérea (cm) de mudas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f. após 60 dias de aclimatização.

O resultado mostra a inibição da síntese de giberelinas provocado pelo PBZ e, consequentemente, a redução do crescimento vegetativo (LEVER, 1986) e da elongação celular (TOMLIN,1995).

A redução da parte aérea pode ser benéfica, pois, de acordo com Moraes (2002), a perda de água por transpiração pode ser reduzida em razão da diminuição da área foliar, da temperatura das folhas e também da quantidade de radiação absorvida.

Ichinose (2012), ao testar diferentes doses de PBZ, verificou redução na altura da parte aérea em *Sophranitis cernua*, assim como Torres e Mogollón (2002) também relataram redução no comprimento dos brotos de orquídeas *Cattleya mossiae*.

O diâmetro das raízes em casa de vegetação teve maior incremento na concentração de 1,5 mg L⁻¹, sendo este 114,2% maior que o tratamento sem PBZ (Figura 13).

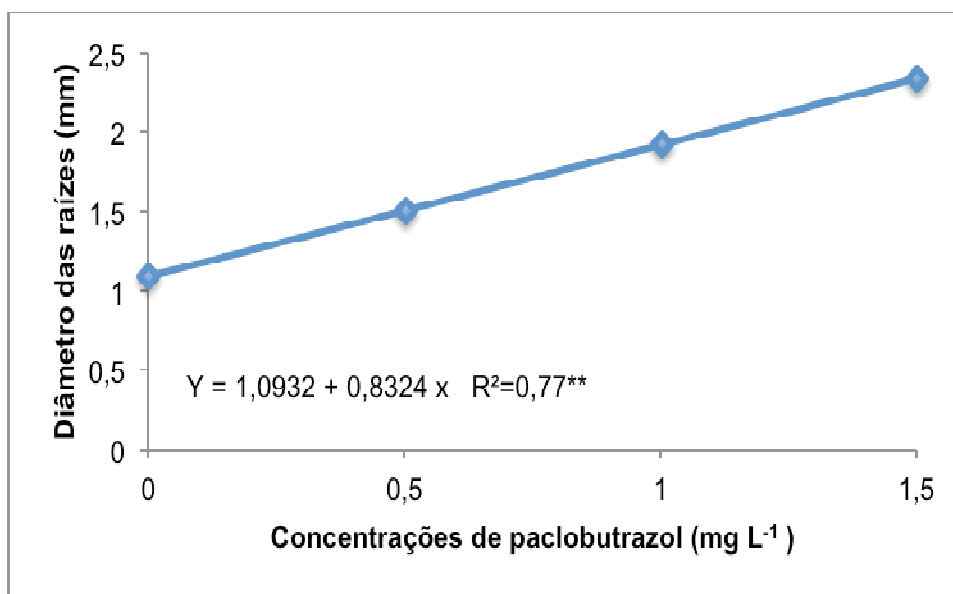
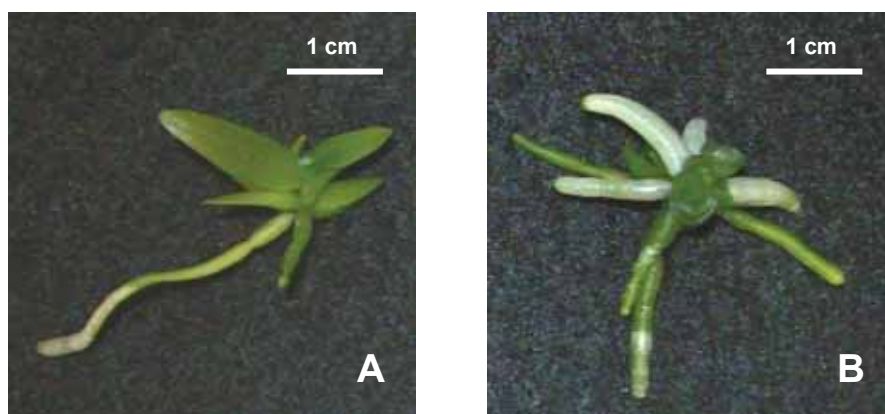


Figura 13. Diâmetro das raízes (mm) de mudas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f. após 60 dias de aclimatização.

O cultivo *in vitro* suplementado com PBZ aumenta a resistência ao estresse e promove o engrossamento das raízes, favorecendo o processo de aclimatização das mudas (CANTO, et al., 2004).

Não houve ajuste de regressão para a variável área foliar, número das raízes e das folhas, comprimento das raízes e massa de matéria seca da parte aérea e da raiz durante o cultivo *ex vitro*.

Na Figura 14, observa-se uma muda que não foi tratada com PBZ, apresentando raízes mais longas e finas e folhas mais desenvolvidas, quando comparada com uma muda tratada com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de PBZ.



T1 – 0 mg L^{-1}

T4 – $1,5 \text{ mg L}^{-1}$

Figura 14. Mudas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f., após 60 dias de aclimatização, provenientes de cultivo em meio MS sem adição de paclobutrazol (A) e suplementado (B) com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de PBZ.

O PBZ promoveu taxas de sobrevivência superiores em relação ao tratamento controle (Figura 15), tendo destaque a concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ com 30 dias do transplante e a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ com 15 dias do transplante, sendo respectivamente 89,41% e 38,92% a taxa em relação ao tratamento controle.

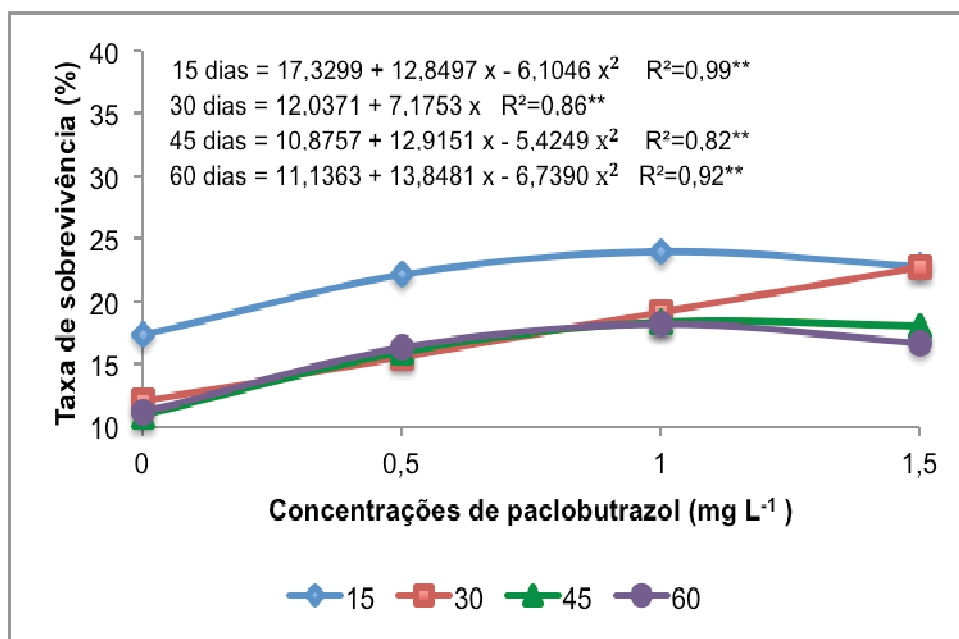


Figura 15. Taxa de sobrevivência de mudas de *Cattleya schilleriana* Rchb.f. após 60 dias de aclimatização.

A orquídea *C. schilleriana* respondeu positivamente ao uso do PBZ, pois a concentração de 1 mg L⁻¹ apresentou maiores taxas de sobrevivência, que diminuíram com a maior concentração testada (1,5 mg L⁻¹). Para o 30º dia de avaliação, houve uma regressão linear positiva com o aumento das concentrações do triazol.

Testando as mesmas concentrações para as orquídeas *Sophranitis cernua* e *Brassavola flagellaris* (ICHINOSE, 2012) e, neste estudo, para *Zygopetalum crinitum*, observou-se que a taxa de sobrevivência diminuiu com o aumento da concentração de PBZ.

Observou-se também que o uso do PBZ permitiu uma rápida adaptação, pois os efeitos positivos foram observados 15 dias após o transplante das mudas, com o aumento da taxa de sobrevivência, concordando com o preconizado por Kozak, (2006) e Thakur et al. (2006).

3.4. Conclusão

A suplementação do meio de cultivo com paclobutrazol aumentou a massa de matéria seca da parte aérea e das raízes, e promoveu engrossamento das raízes.

Na aclimatização, verificou-se redução no comprimento da parte aérea e engrossamento das raízes.

As alterações morfofisiológicas promovidas nas plântulas pela aplicação de paclobutrazol implicaram melhores taxas de sobrevivência da orquídea *Cattleya schilleriana*.

3.5. Referências

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução normativa de setembro de 2008**. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/e/a32>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. Organs and embryos. In: _____. **Plant tissue culture**. [S.l.]: Edwad Publishing, 1976. p. 3-15.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M. de; FONSECA, I. C. de. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n. 1, p. 145-150, 2005.

CORDEIRO, G. M.; RIGHETO, M. V. L.; BATAGIN, K. D.; ALMEIDA, M. de. Avaliação anatômica e histoquímica de raízes de *Cattleya labiata* cultivadas *in vitro* na presença de paclobutazol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP - SIICUSP, 18., 2010, Piracicaba. **Anais...** Disponível em: <<https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2287&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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

DAZIEL, J.; LAWRENCE, D. K. Biochemical and biological effects of kaurene oxidase inhibitors, such as paclobutrazol. **British Plant Growth Regulators Group Monographs**, Bristol, v.4, p.1-14, 1984.

DEBERG, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. 484 p.

DÍAZ-PÉREZ, J., SHACKEL, K. A.; SUTTER, G. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 9, p. 225-232, 1995.

DIXON, R. A. Isolations an maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: DIXON, R. R. (Ed.). **Plant cell culture: a pratical approach**. Washington DC: IRL Press, 1985. p. 1-20.

FARIA, R. T.; REGO, R. V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of differents genotyps of brazilian orchid cultivation in alternatives substrates. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 337-342, 2001.

FLETCHER, R. A.; GILLEY, A.; SANKHL, A. N.; DAVIS, T. D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.24, p. 55–138, 2000.

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

ICHINOSE, J. G. S. **Paclobutrazol no crescimento e desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Sophronitis cernua* (Lindl.) Lindl. e *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. (Orchidaceae)**. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

KOZAK, D. The effect of growth retardants applied in vitro on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vivo*. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cults**, Lublin, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2006. Disponível em: <<http://www.aqua.ar.wroc.pl/acta/pl/full/7/2006/000070200600005000010006500070.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KOZAK, D. The effect of growth retardants applied in vitro on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vivo*. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cults**, Lublin, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2006. Disponível em: <<http://www.aqua.ar.wroc.pl/acta/pl/full/7/2006/000070200600005000010006500070.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012.

MORAES, C. P. **Fenologia e anatomia dos órgãos reprodutivos de *Catsetum fimbriatum* Lindley cultivados sob diferentes intensidades luminosas**. 2002. 80 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

SILVA, L. M. G. **Doses e métodos de aplicação do paclobutrazol em mangueiras cv. Tommy Atkins**. 2000. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Administração, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2000.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n. esp., p. 1532-1538, 2003. Disponível em: <http://www.cloud.editora.ufla.br/revistas/cienagro/pdf/27-E-2003_11.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

SOUZA, J. A. de; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; SOARES, G. C. Estabelecimento da Propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 115-118, 2007. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v13n1/artigo18.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: *Cattleya* e seus híbridos**. Fortaleza-CE, 2010. p. 17-25.

TE-CHATO, S.; NUJEEN, P.; MUANGSORN, S. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's *Dendrobium* orchid *in vitro* **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 157-165, 2009. Disponível em: <http://www.ijat-aatsea.com/pdf/june_v5_n1_09/14-14-ijat2008_45f.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P. K.; PANDEY, S.; SOBTI, R. C.; AHUJA, P. S. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 25, n. 5, p. 382–391, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-005-0094-1>>.

TOMLIN, C. **The pesticide manual handboock**. 10th. ed. Hampshire: British Crop Protection Council, 1995. 1341 p.

TONGUMPAI, P. **Flower induction of mango**. Kasetsart: University of Thailand, 1991. (Extension Bulletin, 19).

TORRES, J.; MOGOLLÓN, N. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previo a la aclimatización. **Bioagro**, Barquisimeto, n. 14, p. 25-28, 2002. Disponível em: <[www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14\(1\)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14(1)/4.%20Efecto%20del%20paclobutrazol.pdf)>. Acesso em: 3 dez. 2012.