



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

ANTONIO ANDERSON DE JESUS RODRIGUES

ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata* E *Phalaenopsis* sp.

FORTALEZA

2014

ANTONIO ANDERSON DE JESUS RODRIGUES

ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata* E *Phalaenopsis* sp.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Roberto Jun Takane

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- R611e Rodrigues, Antonio Anderson de Jesus.
Estiolamento *in vitro* de *Cattleya labiata* e *Phalaenopsis* sp. / Antonio Anderson de Jesus Rodrigues. – 2014.
73 f. il., color. enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Fortaleza, 2014.
Área de concentração: Cultura de Tecidos Vegetais.
Orientação: Prof. Dr. Roberto Jun Takane.
Coorientação: Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.
1. Orquídea. 2. Estiolamento. 3. Cultivo. 4. Cultura de tecidos. I. Título.

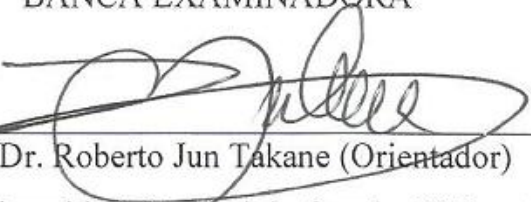
ANTONIO ANDERSON DE JESUS RODRIGUES

ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata* E *Phalaenopsis* sp.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Horticultura.

Aprovada em: 25/02/2014.

BANCA EXAMINADORA

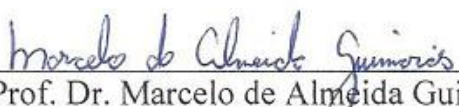


Prof. Dr. Roberto Jun Takane (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (Coorientadora)

Embrapa Agroindústria Tropical



Prof. Dr. Marcelo de Almeida Guimarães

Universidade Federal do Ceará – UFC

Dra. Ana Cecília Ribeiro de Castro

Dra. Ana Cecília Ribeiro de Castro

Embrapa Agroindústria Tropical

Aos meus pais, Damião Clayton Rodrigues e Sonia Maria de Jesus, pelo verdadeiro amor e valiosíssima contribuição na minha formação pessoal e profissional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por me fortalecer em todos os momentos e por nunca me fazer desistir do que realmente quero, pois tenho certeza absoluta de que a força que nos move, que nos impulsiona e nos dá a certeza de onde queremos chegar, vem DELE.

Aos meus pais Sônia e Clayton e aos demais membros da minha família (Nizia, Priscylla, Rayssa e Sofia), com quem aprendi valores que levarei pelo resto da minha vida, pelo amor, apoio, compreensão, paciência e que sempre estiveram dispostos a me ajudar e a me apoiar em todas as minhas decisões. Vocês são partes essenciais da minha história e das minhas conquistas.

Aos meus amigos de infância, Hermeson, Bruno e Glauberto pela amizade, confiança e convivência.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A todos os professores da Universidade Federal do Ceará, pela significativa contribuição na minha formação.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP pela concessão de bolsa.

Ao meu orientador Dr. Roberto Jun Takane, pela grande confiança em mim depositada, pela paciência, pelos ensinamentos e pela orientação durante a realização deste trabalho.

A minha coorientadora a pesquisadora Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, pela orientação e valiosa contribuição na minha formação científica e pessoal, pela amizade, convivência e confiança que sempre me foi dada. Meus sinceros agradecimentos.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por ter sempre disponibilizado condições físicas e materiais para a realização de todos os experimentos.

Ao professor Dr. Marcelo de Almeida Guimarães, pelo apoio na realização de alguns trabalhos, pelos ensinamentos e por aceitar a compor a banca da defesa.

A pesquisadora da Embrapa, Dra. Ana Cecília Ribeiro de Castro, pelo apoio, conselhos, ensinamentos e pelas relevantes contribuições dadas para a realização deste trabalho e por aceitar a compor a banca da defesa.

Aos meus amigos e colegas do curso de Farmácia, Jéssica, Thales, Rafael “O El”, Raphaela, Raphael “pH”, Paulo Iury, Manuel, Alexandre, Iandra e Luciana “Satie”, que mesmo não tendo mais o convívio diário não “deixaram” que eu me afastasse ou desistisse das saídas com a turma. Vocês fizeram esse período da minha vida mais divertido e menos estressante.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, da Embrapa Agroindústria Tropical, Myrella, Gigi, Cecília, Ravena, André, Abelardo, Priscila, Ananda, Sérgio e as “bioquitas” Cleá e Juliana, pela paciência, amizade, pelos momentos de descontração e por todas as ajudas diretas e indiretas para a realização de todos os experimentos.

Aos amigos que pertencem ou que pertenceram ao grupo CEFHOR, Rebeca, Wanderlúcia, Adriely, Felipe, Iago, Luciana, Gleison, Ulisses, Cyro, Suziane, Lydio, Ingrid, Juliany, Thaíse, Moana, Cristiano e Arivaldo. Obrigado pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de brincadeira e descontração na Horta Didática.

As minhas queridas “Kakas”: Kássia e Karol pela amizade, paciência e pelos momentos de descontração. À Karol, por sempre me apoiar e me incentivar a nunca desistir dos meus objetivos e à Kássia por mostrar que sonhar alto nunca é demais!!!!

Aos meus grandes amigos da Graduação, Eder, Esdras, Evaldo e Iury, pelo valioso super-companheirismo e pela solidariedade nos momentos mais difíceis, pela ajuda, pelos vários momentos de descontração e por me “suportarem” todo esse tempo. Sei que não foi fácil!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso não só deste trabalho, mas que de alguma forma influenciaram e fizeram parte da minha vida.

ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata* E *Phalaenopsis* sp.

RESUMO - As orquídeas são plantas ornamentais que se destacam principalmente na floricultura devido à beleza, ao exotismo, à diversidade de cores, aos tamanhos e aos formatos de suas flores. A espécie *Cattleya labiata* e as do gênero *Phalaenopsis* apresentam uma grande oferta de opções de cores que tornam suas flores muito valorizadas e demandadas para comercialização. *Cattleya labiata* é nativa do Nordeste brasileiro e suas flores são levemente arroxeadas e perfumadas; enquanto que *Phalaenopsis* sp. produz flores brancas de longa durabilidade. A cultura de tecidos tem sido largamente empregada na multiplicação massiva desses dois gêneros. O estiolamento *in vitro* permite produzir grande número de plantas, reduzindo os riscos da ocorrência de variação somaclonal. Em razão disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e de concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) no estiolamento *in vitro* das orquídeas *Cattleya labiata* e *Phalaenopsis* sp. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente $\pm 1,0$ cm de comprimento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15,0 mL de meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), ANA (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ambientes de cultivo (sala de crescimento no escuro e com 16 horas de luz artificial), em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (2 ambientes x 3 doses de BAP x 3 doses de ANA). Ao final de 150 dias, foram realizadas as seguintes avaliações: a) número de brotos estiolados; b) número de nós por broto estiolado; c) comprimento da brotação principal (cm); d) número de raízes e, e) massa seca total (g). O número de brotos estiolados e de nós (por broto estiolado) em plântulas de *C. labiata* e de nós por broto estiolado em *Phalaenopsis* sp. foram superiores no ambiente em ausência de luz independente do fitorregulador utilizado, entretanto para o número de brotações de *Phalaenopsis* sp. o ambiente luminoso foi o mais favorável. A espécie *C. labiata* apresentou maior número de nós com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de ANA na ausência de BAP, e a orquídea *Phalaenopsis* sp. proporcionou maior número de nós com o emprego de 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Em plântulas de *C. labiata* e *Phalaenopsis* sp. a altura da brotação principal foi superior em ambiente na ausência de luz e, em contraste, o número de raízes e a massa seca total das plântulas foram superiores em ambiente na presença de luz, sendo que para *C. labiata* esses resultados foram independentes do regulador de crescimento utilizado.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultura de tecidos, presença e ausência de luz, 6-benzilaminopurina, ácido naftaleno acético.

***IN VITRO* ETIOLATION OF *Cattleya labiata* AND *Phalaenopsis* sp.**

ABSTRACT

Orchids are ornamental plants that stand out mainly in floriculture due to the beauty, the exoticism, the diversity of colors, the sizes and shapes of their flowers. *Cattleya labiata* and species of the genus *Phalaenopsis* feature a wide range of color choices that make their flowers much valued and demanded for marketing. *Cattleya labiata* is native of the Brazilian Northeast and produces purplish and slightly fragrant flowers; and *Phalaenopsis* sp. produces white flowers for long lasting durability. Tissue culture is widely used in massive multiplication of genres. The *in vitro* etiolation allows to produce large numbers of plants, reducing the risk of somaclonal variation. For this reason, this study aimed to evaluate the influence of different cultivation environments and concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) and NAA (naphthalene acetic acid) *in vitro* etiolation of the orchids *Cattleya labiata* and *Phalaenopsis* sp. Seedlings grown from seeds germinated *in vitro* with approximately ± 1.0 cm in length were inoculated into test tubes containing 15.0 mL of MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0.0, 2.0 and 4, 0 mg L⁻¹), NAA (0.0, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and culture environments (dark growth and room with artificial light) in a factorial 2 x 3 x 3 (2 environments x 3 doses of BAP x 3 doses of NAA). At the end of 150 days, the following evaluations were performed: a) number of etiolated shoots; b) number of nodes per etiolated shoot; c) length of the main sprout (cm); d) number of roots, and e) total dry mass (g). The number of etiolated shoots and nodes (per etiolated shoot) on seedlings of *C. labiata* and nodes per etiolated shoot in *Phalaenopsis* sp. were higher in the environment in the absence of light independent of the phytohormone used, however the number of shoots of *Phalaenopsis* sp. the luminous environment was the most favorable. The species *C. labiata* showed a higher number of nodes with the use of 2.0 mg L⁻¹ of NAA, in the absence of BAP, and *Phalaenopsis* sp. provided the highest number of nodes with the use of 2.0 mg L⁻¹ of NAA. In seedlings of *C. labiata* and *Phalaenopsis* sp. the height of the main budding was higher in the environment in the absence of light, in contrast, the number of roots and total dry weight of seedlings were higher in luminous environment, and for *C. labiata* these results were independent regulator growth used.

Keywords: Orchidaceae, tissue culture, presence and absence of light, 6-benzylaminopurine, naphthalene acetic acid.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Aspectos da flor e do hábito de crescimento epifítico em tronco de árvore de *Cattleya labiata* Lindl na Mata Atlântica.....21

Figura 2 Aspectos da flor e do hábito de crescimento epifítico em tronco de árvore de *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f, espécie representativa do gênero.....22

CAPÍTULO 2

Figura 1 Explante utilizado no estudo: plântula de *Cattleya labiata* Lindl. em tubo de ensaio contendo meio MS. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....46

Figura 2 Plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. cultivadas em ausência de luz (A) e na presença de luz (B), aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....49

CAPÍTULO 3

Figura 1 Aspectos da flor de *Phalaenopsis* sp., espécie usada no estudo.....63

Figura 2 Plântulas de *Phalaenopsis* sp. cultivadas em ausência de luz (A) e na presença de luz (B), aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....66

Figura 3 Número de raízes em plântulas de *Phalaenopsis* sp., desenvolvidas em meio de cultura MS em função da concentração de BAP e ANA, aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Resumo da análise de variância e coeficientes de variação (CV) para número de brotos estiolados por explante (NB/E), número de nós por broto estiolado (NN/B), comprimento da brotação principal (CBP), número de raízes (NR) e massa seca total (MST) das plântulas de *Cattleya labiata* cultivadas em diferentes doses de BAP e ANA na presença e ausência de luz aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013..... 48
- Tabela 2 Número de brotos estiolados por explante, número de nós por broto estiolado e comprimento da brotação principal em *Cattleya labiata* em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....50
- Tabela 3 Número de raízes e massa seca total em *Cattleya labiata* em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....53

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Resumo da análise de variância e coeficientes de variação (CV) para número de brotos estiolados por explante (NB/E), número de nós por broto estiolado (NN/B), comprimento da brotação principal (CBP), número de raízes (NR) e massa seca total (MST) das plântulas de *Phalaenopsis* sp. cultivadas em diferentes doses de BAP e ANA na presença e ausência de luz aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....65
- Tabela 2 Número de brotos estiolados por explante e número de nós por broto estiolado em *Phalaenopsis* sp. em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA, respectivamente, aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....66
- Tabela 3 Comprimento da brotação principal, número de raízes e massa seca total em *Phalaenopsis* sp. em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz), aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.....68

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Aspectos sócio-econômicos do segmento de flores e plantas ornamentais.....	17
2.2 Família Orchidaceae.....	19
2.3 Gênero <i>Cattleya</i>	20
2.4 Gênero <i>Phalaenopsis</i>	21
2.5 Propagação.....	23
2.6 Micropropagação.....	24
2.6.1 Estiolamento <i>in vitro</i>	26
2.6.2 Meio de cultura.....	27
2.6.3 Luz.....	28
2.6.4 Reguladores de crescimento.....	29
3 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 – ESTIOLAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya labiata</i>	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1 Introdução.....	44
2 Material e Métodos.....	46
3 Resultados e Discussão.....	47
4 Conclusões.....	55
5 Referências.....	55
CAPÍTULO 3 – ESTIOLAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Phalaenopsis sp.</i>	59
RESUMO	59
ABSTRACT	60

1	Introdução.....	61
2	Material e Métodos.....	63
3	Resultados e Discussão.....	64
4	Conclusões.....	70
5	Referências.....	70

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A floricultura, em seu sentido amplo, abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. É um setor altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas, profundo conhecimento técnico pelo produtor e que demanda um sistema eficiente de distribuição e comercialização de seus produtos (SILVEIRA, 1993).

No cenário internacional, a exportação de flores e plantas ornamentais no Brasil está longe de alcançar 1% do valor total de US\$ 8 bilhões (JUNQUEIRA; PEETZ, 2010). O mercado de flores é dominado por pequeno número de países compradores, sendo todos localizados no Hemisfério Norte, e um grande número de países exportadores, situados em ambos os Hemisférios. Mesmo assim pôde-se constatar que no período de 2000 e 2008 o País viveu um processo contínuo de recordes sucessivos nas exportações de flores e plantas ornamentais, tendo elevado seus resultados de US\$ 11,97 milhões, em 2000, para US\$ 35,50 milhões, em 2008.

Segundo Junqueira e Peetz (2013) confirmou-se o ciclo de retração recentemente experimentado pela floricultura nacional em 2012, em que as exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais reduziram em 7,6% em relação ao total vendido ao exterior em 2011 e apresentando um fechamento no valor total de US\$ 26,01 milhões. Esse fato reflete o contexto econômico-financeiro recessivo prevalecente nos principais mercados mundiais (EUA, União europeia e Japão), que permanece causando reduções globais na demanda pelos produtos da floricultura.

A grande vantagem da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais do Brasil é sua vocação para o suprimento do mercado interno, o qual concentrou, em 2010, 98,67% do total movimentado pelo setor (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). Ainda segundo os mesmos autores, no âmbito do consumo interno, a floricultura empresarial brasileira vem experimentando um crescimento contínuo, cerca de 15% ao ano, tendo alcançado, no ano passado, a uma movimentação global da ordem de R\$ 3,8 bilhões. Tais indicadores - que se exibem muito acima das já excepcionais taxas de crescimento do PIB (7,5% em 2010) - são reflexos de fatores

altamente positivos como o aumento da renda, do emprego, da ocupação e da ascensão social de importantes parcelas da população.

Entre as principais plantas cultivadas economicamente destacam-se as da família Orchidaceae, com cerca de 800 gêneros e 35.000 espécies, das quais estão presentes no Brasil 2.350 espécies distribuídas em 200 gêneros (FARIA et al., 2012). Representa aproximadamente 40% das Monocotiledôneas, ocorrendo em quase todas as regiões do planeta (DAHLGREN et al., 1985).

O Brasil possui uma grande biodiversidade de orquídeas, principalmente epífitas, entretanto muitas dessas espécies encontram-se em risco de extinção devido a destruição de seus habitats, às coletas predatórias ou ao uso de agroquímicos que atingem seus polinizadores naturais, dessa forma, as plantas permanecem em matas preservadas, embora não se reproduzam, pois não ocorre a polinização nem a formação de cápsulas com sementes (RAVEN et al., 2001).

A propagação das orquídeas pode ser por sementes e por via vegetativa. No processo vegetativo o número de plantas obtidas é bastante reduzido, inviabilizando o fornecimento de mudas uniformes e em grande quantidade para o mercado. Já por via seminífera, ocorre a limitação das sementes serem diminutas e desprovidas de endosperma, necessitando de cultivo *in vitro* para a germinação assimbiótica e também a heterogeneidade devido à polinização cruzada

A cultura de tecidos permite um melhor controle dos fatores de cultivo, possibilitando a obtenção massiva de mudas, com alta qualidade fitossanitária e genética a preços competitivos, o que viabiliza uma produção padronizada exigida pelo mercado consumidor, evitando assim, impactos ao meio ambiente (REDENBAUGH, 1991; TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Entre os diversos fatores do cultivo *in vitro*, o meio de cultura, os reguladores de crescimento e as condições de luminosidade do ambiente de cultivo são essenciais para o melhor desenvolvimento das culturas. Esses fatores podem ser estudados de forma a permitir melhores resultados com relação ao estiolamento *in vitro*.

As plantas, além de possuírem a capacidade de utilizar a luz como fonte de energia no processo fotossintético, possuem a habilidade de distinguir seus gradientes e sua composição espectral. A percepção luminosa gera alterações na morfologia e na estrutura vegetal, como fototropismo, fotonastias e fotomorfogênese (MAJEROWICZ; PERES, 2004).

Já os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura têm por objetivo suprir as eventuais deficiências dos teores endógenos de hormônios vegetais nos explantes, que

se encontram isolados nas regiões produtoras da planta matriz. As auxinas e as citocininas constituem-se nas duas classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais. Alguns processos de natureza morfogenética, tais como: formação das raízes, parte aérea e de calos, em cultura de tecidos, é regulada pela disponibilidade e interação entre estas duas classes de reguladores (SKOOG; MILLER, 1957; HUSSEY, 1978).

As auxinas respondem pela expansão e pelo alongamento celulares, bem como na divisão celular juntamente com as citocininas na cultura de tecidos vegetais (KRIKORIAN, 1991). De acordo com Hu e Wang (1983), a substância 6-benzilaminopurina (BAP) é importante para induzir a formação de brotações e aumentar a taxa de multiplicação em muitos sistemas da micropropagação.

Sendo assim, determinar os efeitos tanto da variação dos níveis e tipos de reguladores de crescimento quanto das condições de luminosidade é de extrema importância nas etapas de estabelecimento e multiplicação dos explantes na cultura de tecidos.

Considerando as potencialidades do cultivo e vantagens do processo de micropropagação, objetivou-se estudar os aspectos da multiplicação *in vitro* de *Cattleya labiata* e *Phalaenopsis* sp. por meio do método de estiolamento *in vitro* de plântulas sob influência de diferentes ambientes de cultivo e concentrações dos fitorreguladores BAP e ANA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos sócio-econômicos do segmento de flores e plantas ornamentais

Ao longo dos últimos anos, a floricultura brasileira vem adquirindo notável desenvolvimento, caracterizando-se como um dos mais promissores segmentos da horticultura. É nesse contexto, que se visualizam as importantes mudanças estruturais (infraestrutura, rodovias, portos e outros), que sinalizam para o fato de que o Brasil caminha, decisivamente, para a implantação de um modelo de qualidade internacional de gestão e de governança de sua cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. Nesse novo panorama estão sendo geradas inúmeras oportunidades de negócios e de inserção comercial competitiva, eficiente e sustentável para os pólos emergentes de produção distribuídos por todo o País (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

Segundo dados de 2010, a área ocupada pelo setor de floricultura mundial foi estimada em torno de 190 mil ha, movimentando cerca de US\$ 18 bilhões (com base no mercado produtor) e US\$ 54 bilhões (com base no mercado consumidor). No Brasil, os números de varejo giraram em torno de R\$ 2,6 bilhões, o mercado produtor movimentou cerca de R\$ 700 milhões; e o atacadista R\$ 1,1 bilhão (ABSEM, 2010).

A expectativa de vendas para o setor de floricultura no Brasil era de que fossem movimentados R\$ 5,2 bilhões em 2013, representando um aumento de 12% com relação ao ano anterior. Esse segmento vem apresentando um crescimento de 8% a 12% ao ano no volume de vendas, e 15% a 17% no valor movimentado. Entretanto, o Brasil ainda tem muito a ser explorado nesse segmento. O País possui cerca de 7,6 mil produtores de flores e plantas ornamentais, responsáveis pelo cultivo de 350 espécies com cerca de três mil variedades. O setor responde por aproximadamente 194 mil empregos diretos, dos quais 96 mil (49,5%) estão concentrados na fase de produção; 77 mil (39,7%) no varejo; 6 mil (3,1%) na distribuição; e 15 mil (7,7%) em outras funções, principalmente de apoio. A média anual de consumo de flores e plantas ornamentais no País é de cerca de R\$ 23,00 (US\$ 12,00) por pessoa, valor este muito inferior ao consumo per capita dos europeus, que é em torno de R\$ 141,00 (US\$ 70,00) por habitante/ano (SNA, 2013). O baixo consumo nacional apresenta um mercado interno em potencial, proporcionando ao produtor buscar novos clientes, e conseqüentemente, aumentar as vendas de produtos oriundos do setor de floricultura.

O comércio de flores e plantas ornamentais no mercado nacional está concentrado tradicionalmente nos meses de maio e junho, que reúnem as duas mais importantes datas comemorativas para o setor: o Dia das Mães e do Dia dos Namorados. O binômio responsável pela grande composição das vendas é representado pelas rosas vermelhas (corte) e orquídeas do gênero *Phalaenopsis* (vaso) (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011).

Os principais gêneros e híbridos produzidos são *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* e *Oncidium*, sendo que alguns gêneros, como *Epidendrum*, *Paphiopedilum* e *Vanda* estão despontando nesta área (PASQUAL et al., 2005).

O cultivo de orquídeas apresenta um expressivo crescimento de produtividade, principalmente pela introdução de novas tecnologias associadas ao surgimento de novas espécies e variedades, disponibilizadas no mercado, refletindo o crescimento no comércio destas plantas nos mercados interno e externo (TAKANE; YANAGISAWA, 2007).

2.2 Família Orchidaceae

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de grande valor comercial, devido, principalmente por sua beleza, forma e cor de suas flores e pela facilidade na realização de combinações genéticas, por meio de cruzamentos. Suas espécies dificilmente formam sementes, e, quando formam, apenas 3 a 5% germinam (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas com flores bem diversificadas, com cerca de 800 gêneros, contendo 35 mil espécies descritas e valorizadas pela beleza e durabilidade de suas flores que exibem uma ampla diversidade em tamanho, forma, coloração e fragrância (ROBERTS; DIXON, 2008; FARIA et al., 2012). Pertencem à classe Monocotiledônea e são consideradas as plantas mais evoluídas do reino vegetal, devido a grande modificação de suas flores (PAULA; SILVA, 2001).

Essas plantas apresentam hábitos variados, podendo ser epífitas, terrícolas, saprófitas ou rupícolas; sendo que a grande maioria das orquídeas são epífitas (BLACK, 1984).

As orquídeas podem ocupar quase todos os habitats. Estas plantas podem ser encontradas em praticamente todas as regiões do planeta, salvo os desertos e desde as proximidades do Ártico e da Antártica. O maior número de espécies e de gêneros encontra-se nas regiões tropicais, em que predominam as plantas de hábitos epifíticos e rupícolas, enquanto que fora dos trópicos predominam as formas terrícolas (KERBAUY, 1995).

Esta ampla distribuição geográfica, ambiental e climática reflete a necessidade de desenvolvimento de numerosos caracteres adaptativos presentes na família Orchidaceae para a sobrevivência nesses diferentes habitats. As adaptações selecionadas evolutivamente refletem na diversidade e multiplicidade de padrões de crescimento, coloração, forma e suculência das folhas e flores das espécies (CHAER, 2012).

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies da família Orchidaceae, principalmente as formas epífitas, que são representadas por cerca de 200 gêneros, e destes, aproximadamente 3.500 espécies e inúmeros híbridos de formas, tamanhos, aromas, cores, folhas e flores variadas. Na floricultura destaca-se como um importante grupo de plantas ornamentais, de interesse econômico, botânico e inclusive de importância para a indústria medicinal, cosmética e alimentícia (SILVA, 2003; ARAÚJO, 2004).

Na medicina tradicional, o extrato feito de *Cyrtopodium cardiochilum* apresenta propriedades imunológicas importantes no tratamento da tuberculose (BARRETO; PARENTE, 2006). Os caules de *Dendrobium* spp. são usados como fitoterápicos na China por apresentar atividades antioxidantes, antitumorais e antimutagênicas (FAN et al., 2001; CHIEN et al., 2008). Na indústria, a espécie *Vanilla planifolia* Andrews produz a baunilha, conhecida essência aromatizante e condimentar (DIVAKARAN et al., 2006) e a *Orchis máscula* é utilizada na produção de sorvetes na Turquia e na produção de bebidas (ROBERTS; DIXON, 2008).

Os gêneros mais importantes, do ponto de vista econômico, são *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Laelia* e *Oncidium*; devido à grande beleza de suas flores, que apresentam uma grande variação na cor, tamanho, forma e fragrâncias, o que possibilitou que o cultivo de orquídeas se tornasse uma atividade muito importante (HEW; YONG, 1997).

Existem muitas orquídeas tropicais que apresentam risco de extinção, sendo, portanto necessárias, ações que visem à preservação dessas espécies para retirá-las desta condição (FARIA et al., 2001). Segundo uma lista divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente, há um número significativo de espécies de orquídeas (34), que estão ameaçadas de extinção e, têm ainda mais 24 espécies que não estão incluídas na lista por falta de dados concretos (BRASIL, 2008). Dentre as ações antrópicas responsáveis estão as coletas predatórias e o aumento das fronteiras agrícolas, que substituem a floresta, seu habitat natural, para realização de atividades como a pecuária e os cultivos agrícolas (COLOMBO et al., 2005).

2.3 Gênero *Cattleya*

O gênero *Cattleya* tem como origem a América Tropical e Subtropical, na região compreendida entre o México e o Brasil; engloba cerca de 70 espécies e inúmeras variedades de híbridos naturais, constituindo-se em um dos gêneros de orquídeas mais populares e cultivados (RAPOSO, 1993). As orquídeas pertencentes ao gênero *Cattleya* são exclusivamente epífitas, vivendo, em sua grande maioria, sobre troncos de árvores e arbustos. Todas apresentam crescimento simpodial; o rizoma não é subterrâneo, crescendo rente ao tronco ou ao substrato; o pseudobulbo constitui-se no principal órgão de reserva; as folhas podem ser unifolioladas ou bifolioladas (TAKANE et al., 2010).

A espécie *Cattleya labiata* Lindl. é nativa do Nordeste brasileiro, e seu florescimento se dá entre os meses de março à junho (MILLER; WARREN, 1996). Ela ocorre em alguns estados do Nordeste (Alagoas, Ceará, Paraíba e Pernambuco), recebendo por isso o título de “Rainha do Nordeste” por alguns orquidófilos. Possui significativa participação na orquidocultura mundial, dada a sua inclusão como planta ornamental em si, e, indiretamente, como participante em milhares de cruzamentos genéticos que trouxeram a esse setor uma infinidade de híbridos de alta qualidade e extensivamente cultivados em todo o mundo, contudo a pressão antrópica representada pela coleta e destruição de seu habitat vem reduzindo drasticamente as populações naturais da espécie nesses estados (REIS et al., 2011). O Ceará é um dos centros de origem e diversificação dessa espécie (Figura 1).



Figura 1 - Aspectos da flor e do hábito de crescimento epifítico em tronco de árvore de *Cattleya labiata* Lindl na Mata Atlântica. Foto: Eric Kataoka.

2.4 Gênero *Phalaenopsis*

O gênero *Phalaenopsis* compreende cerca de 66 espécies de orquídeas de hábito epifítico e apresentando folhas suculentas (Figura 2) (TSAI et al., 2003). São plantas originárias das regiões tropicais e subtropicais do planeta, principalmente na região do sudeste asiático, e atualmente estão entre as orquídeas mais populares entre os produtores comerciais (LEE, 2011).



Figura 2 - Aspectos da flor e do hábito de crescimento epifítico em tronco de árvore de *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f., espécie representativa do gênero. Foto: Eric Kataoka.

Essas plantas destacam-se pela exotividade de suas inflorescências, que apresentam muitas flores de grande durabilidade, razões pelas quais explicam a grande popularidade desse gênero. As plantas de *Phalaenopsis* apresentam crescimento monopodial, terminando com um meristema vegetativo, com inflorescências nas axilas foliares. As flores possuem um aspecto achatado com labelo curto e as pétalas são menores que as sépalas, formando belíssimos conjuntos de flores ovaladas ou ligeiramente arredondadas, que variam do branco ao violeta intenso, passando por matizes amareladas ou manchadas (MINAMIGUCHI; MACHADO NETO, 2007).

O gênero *Phalaenopsis* possui um grande potencial ornamental e comercial no Brasil e no mundo, pois consiste em um dos poucos da família Orchidaceae que possui um florescimento periódico de seis meses, desenvolve-se em temperaturas entre 18 e 28 °C (ORI, 2006) e apresenta uma boa resposta à indução floral artificial (frio, luz ou giberelinas), processo pelo qual o florescimento ocorre após um estímulo provocado, o que não se aplica satisfatoriamente à maioria gêneros de orquídeas de interesse econômico (LEE, 2011).

2.5 Propagação

A propagação de orquídeas, em condições naturais, se dá pela proliferação de mudas laterais (brotações) ou disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. As cápsulas contêm milhares de sementes desprovidas de endocarpo e de tamanho extremamente pequeno, contendo um embrião de aproximadamente 0,1 mm que, no processo de germinação, dilata-se formando uma estrutura chamada de protocormo. Esse método gera variabilidade genética, produzindo plantas desuniformes (HOFFMANN et al., 1997).

A dificuldade na propagação de orquídeas em condições artificiais pode ser explicada pela baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas. Na natureza, ocorre a deiscência das cápsulas e as sementes são lançadas no ambiente e, entrando em contato com as micorrizas nas raízes das plantas adultas da mesma espécie, se associam e germinam (RAMOS; CARNEIRO, 2007). Essa relação simbiótica entre as sementes e os fungos micorrízicos é fator determinante, que garante a sobrevivência da semente e que resulta na retomada do desenvolvimento embrionário.

O método de propagação vegetativa, que é realizado por meio da separação de rebentos laterais, é uma alternativa para a manutenção de plantas com características desejáveis ou raras. Entretanto constitui-se em um processo extremamente lento e, além disso, expõe a planta matriz ao ataque de pragas e doenças, ou até mesmo pela planta não resistir a separação em mudas, colocando o material vegetal em risco (DIGNART, 2006).

Devido ao baixo rendimento apresentado pelos métodos convencionais de propagação, outros processos, como o cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido excelente alternativa a ser empregada para a propagação de orquídeas. Esta metodologia apresenta muitas vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, elevada produção massiva de forma

rápida e eficiente, alta qualidade genética e fitossanitária, em um pequeno espaço físico e em curto período de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido uma excelente alternativa a ser empregada para a propagação de muitas espécies. Diversas técnicas de cultura de tecidos são aplicadas industrialmente, como alternativas viáveis economicamente, e vêm sendo utilizadas com sucesso na propagação de plantas ornamentais (COSTA et al., 2013).

2.6 Micropropagação

A micropropagação ou sistema de propagação vegetativa *in vitro* é um método rápido, prático e seguro, que se baseia em quatro fases: a) seleção de explantes, seguida de desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas; b) multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos empregando meio de cultura adequado; c) alongamento e rizogênese em meio de enraizamento; e d) aclimatização sob condições controladas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As mudas obtidas podem ser originadas de tecidos meristemáticos ou não meristemáticos, como fontes de explantes (propágulos iniciais), e sido regeneradas diretamente do explante (organogênese direta) (RODRIGUES, 2005) ou indiretamente (organogênese indireta) por meio de calos formados nos próprios explantes (GOH et al., 1995) ou ainda por meio de tecido embrionário (embriogênese somática direta) ou tecido maduro desdiferenciado (embriogênese somática indireta) (ZIMMERMANN, 2010).

A cultura de tecidos de plantas exprime o conceito de que diferentes tipos de tecidos da planta podem ser cultivados, sob condições assépticas e *in vitro*, visando micropropagação, melhoramento, conservação e limpeza clonal. A micropropagação é um termo genérico usado exclusivamente para referir-se à propagação *in vitro* a partir de alguma parte específica da planta, denominada explante, baseada em propriedades das células vegetais, como a capacidade morfogenética e totipotencial das células (VASIL; HILDERBRANT, 1965).

As técnicas de cultivo *in vitro* são muito importantes para espécies de alto valor comercial, como é o caso das ornamentais consideradas exuberantes, como antúrios, bromélias e orquídeas (DONINI, 2004), gerando mudas isentas de fitopatógenos e idênticas geneticamente (SEGEREN et al., 2003). Comercialmente, é preferível que cultivares de importância agrônômica sejam propagadas por via assexuada, pois esse tipo de propagação proporciona plantas uniformes

quanto as suas características, tais como crescimento, floração e frutificação. Isso é um fator importante uma vez que essas plantas são altamente selecionadas para características desejadas como a alta produção e resistência a doenças (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010), uma vez que o setor da floricultura demanda grande número de mudas uniformes e de alta qualidade genética e fitossanitária durante todo o ano (CARVALHO et al., 2013).

A escolha do tipo de explante é dependente de vários fatores que determinam a viabilidade de sua utilização, tais como: disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estação do ano (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010), entre outras.

A micropropagação é um método de estimada importância prática e potencial na agricultura, com especial enfoque na produção de plantas em larga escala, no intercâmbio de germoplasma, bem como na pesquisa básica, principalmente em citologia e fisiologia celular. O uso das técnicas de micropropagação tem se destacado, principalmente, no lançamento de novas variedades, permitindo o rápido acesso dos agricultores às novas cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético. De maior utilização em espécies de propagação vegetativa, tornou-se viável também para formação de clones de genótipos superiores de espécies que se reproduzem por sementes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

No entanto, para o uso prático da micropropagação é necessário melhorar e adequar as condições de cultivo para cada espécie e/ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in vitro*, estão os fitorreguladores, em especial as citocininas, como o BAP (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000).

A cultura de tecidos já é empregada em muitas espécies do gênero *Cattleya* e encontram-se disponíveis diversos trabalhos na literatura. Dentre eles destaca-se o trabalho de Ventura (2007), que estudou o cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii* e *Cattleya bicolor* em diferentes formulações químicas de meios de cultura e observou que as melhores respostas de *C. loddigessi* foram obtidas com o aumento da concentração de sais e de sacarose e para *C. bicolor* os melhores resultados foram obtidos com a adição de carvão ativado em meio Peter's (meio composto por nutrientes do adubo comercial Peter's); e também a germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya amethystoglossa* com adição de diferentes concentrações de carvão ativado em meio de cultura MN (meio Knudson modificado), verificando um efeito prejudicial na germinação e um retardo no crescimento de protocormos dessa espécie independente da dose de carvão ativado utilizado. Vieira et al. (2009) verificaram efeitos positivos da utilização de polpa

da banana e água de coco no crescimento *in vitro* do híbrido *C. labiata* x *C. forbesii*; Galdiano Junior et al. (2013) estudaram a influência da concentração da sacarose no desenvolvimento *in vitro* de *C. loddigesii* e observaram que a concentração de 20 mg L⁻¹ apresentou maior eficiência no crescimento *in vitro* nessa espécie e Braz et al. (2013) avaliaram a influência de concentrações do biopolímero quitosana no crescimento *in vitro* de *C. labiata* e observaram a viabilidade da utilização desse biopolímero na cultura de tecidos vegetais na obtenção de plantas com melhor desempenho em seu crescimento.

Para o gênero *Phalaenopsis* também existem vários trabalhos na literatura que reportam à aplicação da cultura de tecidos para esse gênero. Um deles estudou a influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis em *P. amabilis* em cultivo *in vitro* obtendo diferentes respostas em função do tipo de auxinas e suas concentrações (ORI, 2006). Em outro trabalho foi avaliado o uso de fertilizantes comerciais e polpa da banana no cultivo *in vitro* do híbrido *P. amabilis* x *P. equestris* onde os autores concluíram que o tratamento composto por Biofert[®] acrescido de polpa de banana apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento *in vitro* desse híbrido (COLOMBO et al., 2012). Sinha e Jahan (2011) estudando a propagação *in vitro* de segmentos foliares de *P. amabilis* cv. ‘Golden Horizon’ obtiveram os melhores resultados com o uso de 2,5 g L⁻¹ de polpa de banana adicionada ao meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Na multiplicação *in vitro* de *Phalaenopsis gigantea*, Samarfard et al (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de quitosana e TDZ e observaram os melhores resultados em meio acrescido de 10 mg L⁻¹ de quitosana + 0,1 mg L⁻¹ de TDZ.

2.6.1 Estiolamento *in vitro*

As plantas apresentam características fenotípicas diferentes e opostas quando são desenvolvidas em ambiente com ou sem luz. As plântulas que são submetidas à ausência de luminosidade passam por um tipo especial de desenvolvimento denominado escotomorfogênese. Tais plântulas desenvolvem caules alongados e esbranquiçados, folhas curtas, entrenós afastados e não conseguem acumular clorofila. Devido a essas características tais plântulas são ditas estioladas (CHORY et al., 1996; SUZUKI et al., 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Outras características relacionadas às plantas estioladas referem-se à reduzida lignificação e suberização das células, tornando as paredes celulares mais delgadas. Esta

característica mostra-se vantajosa na micropropagação de plantas estioladas, pois a redução nos processos de lignificação e suberização auxilia no desenvolvimento de segmentos nodais quando isolados *in vitro*, como a facilidade do processo de enraizamento devido à diminuição das barreiras mecânicas no tecido caulinar (BASSUK; MAYNARD, 1987).

Com vistas à obtenção em larga escala de mudas geneticamente idênticas a partir da regeneração de órgãos, o processo de estiolamento *in vitro* tem sido frequentemente adotado por evitar a ocorrência de alterações genéticas desconhecidas, as chamadas variações somaclonais, em *Catsetum* no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de São Paulo, e vem sendo utilizado desde 1993 sem apresentar nenhuma alteração genética perceptível (KERBAUY, 2011).

Sendo assim, o estiolamento é largamente utilizado no cultivo *in vitro* de espécies ornamentais como abacaxi ornamental (*Ananas comosus*) (CARVALHO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; SOUZA et al., 2010; DIAS et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012), antúrio (PINHEIRO et al., 2009) e orquídeas (RAMOS; CARNEIRO, 2007; SOARES et al., 2010). Tal processo também vem sendo utilizado com outras espécies, tais como batata (PING et al., 2010), *Persea americana* (ESCOBEDO; ESCOBEDO, 2011) e *Hypericum hookerianum* (SOORIAMUTHU et al., 2013).

2.6.2 Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são conservadas também em material vegetal nas condições *in vitro*. Por isso os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas de uma determinada espécie *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Desempenha diversas funções na manutenção da sobrevivência do explante em condições *in vitro*, pois ao mesmo tempo em que serve de suporte físico, proporciona os nutrientes necessários à sua sobrevivência (GEORGE, 1996).

Nessa perspectiva, os meios nutritivos e a sua composição regem a importante função de conversão dos explantes em propágulos, e destes em mudas. Muitos fatores encontram-se envolvidos no desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração, tais como: tipo de

meio básico de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, fonte de explante, etc. (ZHANG et al, 2003). Se o meio nutritivo não for adequado ou se vier a falhar em virtude de alguns de seus componentes, não se obtém sucesso na obtenção de plantas (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

Os ingredientes utilizados tradicionalmente na composição de um meio nutritivo são: compostos inorgânicos, como os macronutrientes (cálcio, magnésio, enxofre, potássio, fósforo e nitrogênio) e os micronutrientes (ferro, zinco, manganês, cobre, cloro, molibdênio e boro); compostos orgânicos, como a sacarose e as vitaminas, e substâncias complexas naturais, tais como: hidrolisado de caseína, água de coco, extrato de malte, extrato de levedura e banana passada no liquidificador.

Existem várias formulações de meios nutritivos para a propagação *in vitro* de orquídeas, entre as quais se destacam: o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962); o Knudson C (KNUDSON, 1946) e o Vacin & Went (VACIN; WENT, 1949). A escolha por um desses meios, em geral é baseada na literatura, na experiência com cada espécie vegetal ou na tentativa empírica. Ademais, quando se tratar de requerimentos nutricionais específicos, eles vão depender da espécie ou das condições fisiológicas do explante (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

A formulação MS de Murashige e Skoog (1962) é a mais utilizada para diferentes processos de cultura de tecidos, incluindo a micropropagação, destacando-se por apresentar bons resultados para diversas espécies e tipos de explantes. Modificações e diluições deste meio também têm sido empregadas com sucesso (SILVEIRA et al., 2001). As variações mais frequentes do meio básico estão relacionadas à composição de macronutrientes e de fitorreguladores, quanto ao efeito sobre o crescimento e o desenvolvimento dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.6.3 Luz

Em um laboratório de cultura de tecidos vegetais é importante cuidar da energia irradiante para promover um bom desenvolvimento de culturas *in vitro*. Normalmente, lâmpadas fluorescentes comuns são usadas como fontes luminosas. Elas são mais eficientes que as lâmpadas incandescentes, embora sejam mais caras. Além disso, as lâmpadas fluorescentes perdem menos energia em forma de calor (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

As culturas *in vitro* apresentam baixa taxa fotossintética e, assim, devem dispor de uma fonte de carboidratos, normalmente na forma de sacarose. No entanto, essa característica não significa uma menor dependência de luz, já que a mesma tem um papel importante na morfogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Segundo Ammirato (1986), a luz tem uma influência marcante no metabolismo das células, exercendo um grande efeito morfogenético no desenvolvimento da planta *in vitro*. Barrueto Cid (2001) cita a luz como um fator importante para a planta por envolver os processos da fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. A luz promove o crescimento e desenvolvimento das plantas, e três fatores intrínsecos a ela devem ser considerados: qualidade do comprimento de onda, quantidade da intensidade luminosa ou fluxo de fótons e duração do fotoperíodo.

Assim a luz, atua como um sinal para induzir mudanças na planta, permitindo a capturar eficiente da energia luminosa, transformando-a em carboidratos, proteínas e lipídios necessários ao seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.6.4 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, em concentrações específicas, desempenham papel fundamental no crescimento e na morfogênese nas culturas *in vitro* (PIERIK, 1990; FLORES et al., 1998). Esses fatores são regulados pela interação e pelo balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação celular. Já as auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura pelo alongamento celular (GRIMALDI et al., 2008).

Os reguladores de crescimento vegetais suprem as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, os quais se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. George (1996) revela que o ácido naftaleno acético (ANA) é a auxina mais utilizada em meios de multiplicação, seguido pelo ácido indolbutírico (AIB), porém, as concentrações de auxina são frequentemente mais baixas, quando comparadas com as das citocininas, mantendo

um balanço entre auxina/citocinina menor do que um, pois concentrações muito altas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente a formação do sistema radicular ou a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As citocininas quebram a dominância do meristema apical e induzem a proliferação de gemas axilares. Entretanto, diversas combinações de citocinina com outros fitorreguladores são muito comuns para o ajuste dos meios. Entre elas o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. A determinação do balanço entre citocinina e auxina otimiza o protocolo de micropropagação, produzindo partes aéreas suficientemente alongadas, permitindo a passagem direta destas da fase de alongamento para a de aclimatização, e um maior equilíbrio entre o desenvolvimento entre a parte aérea e o sistema radicular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As auxinas, em seu significado etimológico, exprimem a ideia de crescimento, ou seja, desencadeiam vários processos fisiológicos, entre os quais a formação do fruto (PANDOLFINI et al., 2007). Além das suas funções no crescimento e nos tropismos, as auxinas participam na regulação da dominância apical, da iniciação das raízes laterais, da abscisão foliar, da diferenciação vascular, da formação de gemas florais e da filotaxia. As auxinas promovem o crescimento por alongamento, sobretudo pelo aumento da capacidade de extensão da parede celular (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Na cultura de tecidos, as auxinas são frequentemente usadas na indução de calos em explantes e no enraizamento em brotos. São exemplos de auxinas: ácido indolacético (AIA); ácido indolbutírico (AIB); ácido naftaleno acético (ANA); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); e ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (Picloram) (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

Segundo Taiz e Zeiger (2013) embora as citocininas regulem muitos mecanismos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, sendo considerado indicador para essa classe de reguladores de crescimento.

Entre as citocininas naturais encontram-se N-4-hidroxi-3-metilbut-2-enilaminopurina (zeatina) e isopentenil adenina (IPA). Entre as citocininas sintéticas, destacam-se 6-furfurilaminopurina (cinetina ou CIN) e BAP (6-benzilaminopurina) (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010). No entanto, entre as citocininas, o BAP é a que tem apresentado os melhores resultados no estabelecimento *in vitro* de explantes (HU; WANG, 1983).

3 REFERÊNCIAS

ABSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e mudas. **Floricultura do CE quer exportar US\$ 5,5 milhões**, 02 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.absem.com.br/noticias.php?cod+1208>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

AMMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p. 23-45.

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

ARAÚJO, A. G.; LÉDO, A. da S.; RIBEIRO, M. M. de J.; ALMEIDA, C. S.; SANTANA, J. G. S. Propagação *in vitro* de abacaxizeiro ‘Vitória’ a partir de brotos estiolados. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS, 3., 2012, Aracaju. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2012.

BARRETO, D. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 64, n. 2, p. 287-291, 2006.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p. 16-21, 2001.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 15-49.

BASSUK, N.; MAYNARD, B. S. Plant etiolation. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 749-750, 1987.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa de setembro de 2008. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/ext/especiais/2008/09/extint.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

BRAZ, C.; AZEVEDO, M.; ULISSES, C. Influência de diferentes concentrações de quitosana no crescimento de *Cattleya labiata*. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 13, 2013. Recife. **Resumos...** Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0664-1.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

CALDAS, L.S. (Ed). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP. EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 99-169.

CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. de M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

CARVALHO, A. C. P. P. de ; TOMBOLATO, A. F. C. ; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O.; SILVA, F. da. Panorama da Cultura de Tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2013, p. 13-53.

CHAER, L. **Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados**. 2012. 111 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CHEN, Y.; LIU, Y.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; YIN, B. Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 1. p. 11-12, 2008.

CHORY, J.; CHATTERJEE, M.; COOK, R. K.; ALICH, T.; FANKHAUSER, C.; LI, J.; NAGPAL, P.; NEFF, M.; PEPPER, A.; POOLE, D.; REDD, J.; VITART, V. From seed germination to flowering light controls, plant development via the pigment phytochrome. Symposium Paper. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 93, p. 12066-12071, 1996.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M. de; FONSECA, I. C. 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.

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

COSTA, M. A. P. de C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. de S. ; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, E. H. de; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2013, p. 373-392.

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

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, G. A.; SANTOS, V. A. dos. Reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 3, p. 383-390, 2011.

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, 2006.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 175-180, 2006.

DONINI, L. P. **Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais**: desinfestação e tratamento antioxidante. 2004. 54 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

ESCOBEDO, V.; ESCOBEDO, J. A. Use of individual dark chambers as a method for obtaining etiolated shoots in nurse plants of 'Duke' avocado (*Persea americana*). **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v. 923, p. 221-225, 2011.

FAN, C.; WANG, W.; WANG, Y.; QIN, G.; ZHAO, W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, n. 1, p. 1255-1258, 2001.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. 1. ed. Mecenaz, Londrina, 2012, v. único. 124p.

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

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.

GALDINO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T. de; LEMOS, E. G. de M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, 2013.

GEORGE, E. F. **Plant propagation and micropropagation: Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. II, p. 37-66, 1996.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GOH, C. J.; NATHAN, M. J.; KUMAR, P. P. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 113-120, 1995.

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-CNPQ, 1998. p. 99-169.

GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

HEW, C. S.; YOUNG, J. W. H. **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**, World Scientific, Singapore, 1997, 331 p.

HOFFMANN, A. M.; PASQUAL, G. R.; CARVALHO, N. N. J.; CHALFUN.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: aplicações na propagação de plantas**. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1997, 130 p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v. 1. p. 177-227, 1983.

HUSSEY, G. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. **Science Progress**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 185-208, 1978.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007. **Hortica Consultoria e Treinamento**, São Paulo, 2008, 8 p. Disponível em: < http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc_Floricultura_2007.pdf >. Acesso em 14 jan. 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Análise Conjuntural do Comercio Exterior da Floricultura Brasileira. 2010. **Hortica Consultoria e Treinamento**, São Paulo, 2010, 9 p. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2010_1_Sem_Com_Exterior_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 18 maio 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Vendas de flores nos dias das mães e dos namorados de 2011: economia aquecida sustenta expansão do consumo. Contexto & Perpectivas: boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Hórtica Consultoria e Treinamento**, São Paulo, 2011, 5 p. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/Contexto_e_Perpectivas_Vendas_de_Flores+nos_Dias_das_Mães_e_Namorados_2011.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. 2012: Balanço do Comércio Exterior da Floricultura Brasileira. Contexto & Perpectivas: boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Hórtica Consultoria e Treinamento**, São Paulo, 2013, 7p. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2012_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2014.

KERBAUY, G. B. Biofábrica de orquídeas. In: GERALD, L. T. S. (coord.). **Biofábrica: Produção industrial de plantas *in vitro***. Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, p. 22-37, 1995.

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

KNUDSON, L. A. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, New York, v. 15, n. 5, p. 214-217, 1946.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición e preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 41-77, 1991.

LEE, L. L. Biofábrica de *Phalaenopsis*. In: Lee TSG (Ed.) **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo, Antiqua. p.150-175. 2011.

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus*

domestica L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 268-271, 2000.

MAJEROWICZ, N.; PERES, L. E. P. Fotomorfogênese em plantas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 542 p.

MINAMIGUCHI, J.; MACHADO NETO, N. B. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*: Orchidaceae, **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 3, n.1, p. 7-13, 2007.

MUNIZ, A. V. C. da S.; PINHEIRO, L. R.; DINIZ, L. E. C.; LEDO, A. da S.; SANTOS, A. R. F. Variabilidade genética de *Cattleya labiata* em população natural localizada em Maranguape, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5., 2011, Joinville. **Resumos...** CD-ROM.

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

ORI, S. S. **Influência das auxinas no desenvolvimento e no teor de carboidratos solúveis, amido e proteína total solúvel em *Phalaenopsis amabilis* (Lineu) Blume (Orchidaceae) cultivada *in vitro***. 2006. 133p. Dissertação. (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

PANDOLFINI, T.; MOLESSINI, B.; SPENA, A. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 237-238, 2007.

PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G. DE; RODRIGUES, V. A.; OLIVEIRA, A. C. Cultivo de orquídeas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 855-94, 2005.

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

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

PING, H.; CHAOHONG, M.; QIAN, Y.; HAIBING. Effect of pH, sugar and agar on occurrence of etiolated seedlings in shoot tip culture of potato. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, Chengdu, v. 23 n. 5 p. 1760-1762, 2010.

PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. de M. G.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROS, L. de M. Micropropagação de antúrio ‘IAC Eidibel’ por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquitae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 1, n. 37, p. 10-15, 2007.

RAPOSO, J. G. C. M. F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Ave Maria, 1993. 308 p.

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

REDENBAUGH, K. Applications of micropropagation for agronomic crops. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (ed.) **Micropropagation: technology and application**. 1. Ed. Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Publishers, 1991, 484 p.

REIS, J. N. P. **Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar?**. In: IX Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 2011, Brasília. Políticas Públicas e a Perspectiva da Economia Ecológica. Brasília - DF: Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 2011. p. 28-29.

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

RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.

SAMARFARD, S.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; SAUD, H. M.; RAVANFAR, S. A.; DANAEI, M. *In vitro* propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thiadiazuron combinations. **HortScience**, Alexandria, v. 49, n. 1, p. 82-88, 2014.

SANTOS, M. da C.; BARBOZA, S. B. S. C.; LÉDO, A. da S.; VIÉGAS, P. R. A.; COPATI, L. A. Efeito do estiolamento na micropropagação de abacaxi cultivar imperial. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 101-110, 2009.

SEGEREN, M. I.; CAMPOS, K. J. P.; CORRÊA, M. G. S.; DIAS, J. C. S. Avaliações de fitossanidade de clones de orquídeas no laboratório Proclone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/ FAEPE, 2003. p. 423.

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

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP e dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.

SILVEIRA, R. B. de A. **Floricultura no Brasil**: pesquisa na UESB. 1993. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

SINHA, P.; JAHAN, M. A. A. Clonal Propagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. cv. 'Golden Horizon' through *in vitro* culture of leaf segments. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, Bangladesh, v. 46, n. 2, p. 163-168, 2011.

SKOOG, F; MILLER, F .O. Chemical regulation of organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, [S. l.], v. 11, p. 118-131, 1957

SNA. Sociedade Nacional de Agricultura. **Mercado de flores deve movimentar R\$ 5,2 bi em 2013**, 12 set. 2013. Disponível em: <<http://sna.agr.br/2013/09/mercado-de-flores-deve-movimentar-r-48-bi-em-2013/>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAÚJO, A. G. de. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1941-1947, 2010.

SOORIAMUTHU, S.; VARGHESE, R. J.; BAYYAPUREDDY, A.; JOHN, S. S. T.; NARAYANAN, R. Light-induced production of antidepressant compounds in etiolated shoot cultures of *Hypericum hookerianum* Wight & Arn. (Hypericaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Gewerbestrasse, v. 115, n. 2, p. 169-178, 2013.

SOUZA, F. V. D.; CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C. Residual effects of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 612-617, 2010.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013, 918 p.

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: UFC. 2010. 179 p.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico (Boletim técnico, 174). 1998. 72 p.

TSAI, C. C.; HUANG, S. C.; HUANG, P.L.; CHOU, C. H. Phylogeny of the genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae) with emphasis on the subgenus *Phalaenopsis* based on the sequences of the internal

transcribed spacers 1 and 2 of rDNA. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. Ashford, v. 78, n. 6, p. 879-887, 2003.

VACIN, E.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, [S. l.], v. 110, p. 605-613, 1949.

VASIL, V.; HILDERBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**, Washington, v. 150, p. 889-892, 1965.

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

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T. de; AGUIAR, R. S. de. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 48-52, 2009.

ZHANG, L.; XU, T.; SUN, X.; ZHANG, H.; TANG, T.; TANG, K. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 67-101.

CAPÍTULO 2 – ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Cattleya labiata*

RESUMO

As orquídeas da espécie *Cattleya labiata* são epífitas, nativas do Nordeste Brasileiro e encontram-se em risco de extinção por conta da coleta predatória e da destruição do seu habitat. A cultura de tecidos vem sendo largamente empregada na multiplicação massiva dessa espécie. Segmentos nodais estiolados são muito utilizados na micropropagação de várias espécies de plantas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e de concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) no estiolamento *in vitro* de *Cattleya labiata*. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente $\pm 1,0$ cm de comprimento, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15,0 mL de meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), ANA (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ambientes de cultivo (sala de crescimento no escuro e com 16 horas de luz artificial), em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (2 ambientes de cultivo x 3 doses de BAP x 3 doses de ANA). Ao final de 150 dias, foram realizadas as seguintes avaliações: a) número de brotos estiolados; b) número de nós por broto estiolado; c) comprimento da brotação principal (cm); d) número de raízes; e, e) massa seca total (g). O número de brotos estiolados e de nós por broto estiolado foi superior no ambiente escuro, independente do fitorregulador utilizado. As maiores médias foram obtidas com a utilização de 4,0 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de ANA para número de brotos estiolados e de 2,0 mg L⁻¹ de ANA para número de nós por broto estiolado, em ausência de luz. A altura da brotação principal foi superior em ambiente sob ausência de luz, em contraste, o número de raízes e massa seca total das plântulas foram superiores em ambiente luminoso, independente do regulador de crescimento adicionado ao meio de cultivo. O estiolamento de plântulas dessa espécie mostra-se vantajosa na produção de brotos *in vitro*.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultura de tecidos, presença e ausência de luz, 6-benzilaminopurina, ácido naftaleno acético.

IN VITRO ETIOLATION OF *Cattleya labiata*

ABSTRACT

The orchids of the species *Cattleya labiata* are epiphytes, native of the Brazilian Northeast, and are in danger of extinction because of predation and habitat destruction. Tissue culture has been widely used in the mass multiplication of this species. Nodal etiolated segments are widely used in micropropagation of several plant species. This study aimed to evaluate the influence of different cultivation environments and concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) and NAA (naphthalene acetic acid) *in vitro* etiolation of the orchids *Cattleya labiata*. Seedlings grown from seeds *in vitro* germinated with approximately ± 1.0 cm in length were inoculated into test tubes containing 15.0 mL of MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0.0, 2.0 and 4, 0 mg L⁻¹), NAA (0.0, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and culture environments (dark and 16 h artificial lighted growth room) in a factorial 2 x 3 x 3 (2 environments x 3 doses of BAP x 3 doses of NAA). At the end of 150 days, the following evaluations were performed: a) etiolated shoot number; b) number of nodes per etiolated shoot; c) length of the main shoot (cm); d) root number, and e) total plant dry mass (g). The number of etiolated shoots and nodes per etiolated shoot were higher in the environment in the absence of light, independent of the phytohormone used. The highest means were obtained with the use of 4.0 mg L⁻¹ of BAP and 1.0 mg L⁻¹ of NAA for number of etiolated shoots and 2.0 mg L⁻¹ of NAA for number of nodes per etiolated shoot in environment in the absence of light. The height of the main sprouting was superior in environment in the absence of light, by contrast, root number and total plant dry mass of seedlings were higher in luminous environment independent of the growth regulator added to the culture medium. The etiolation of seedlings of this species appears to be advantageous in the production of shoots *in vitro*.

Keywords: Orchidaceae, tissue culture, presence and absence of light, 6-benzylaminopurine, naphthalene acetic acid.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e comercializadas no mundo. Entretanto muitas espécies de orquídeas vêm sofrendo grande exploração antrópica por conta de seu elevado potencial econômico e ornamental. Na natureza, a reprodução dessas plantas é realizada por meio de proliferação de mudas laterais ou da disseminação natural de sementes, entretanto estes meios são lentos e muitas dessas espécies correm o risco de extinção (COSTA et al., 2013).

O gênero *Cattleya* é originário da América Tropical e Subtropical, na região compreendida entre o México e o Brasil; engloba em torno de 70 espécies e diversos híbridos naturais. As espécies desse gênero possuem hábitos epifíticos, crescimento simpodial, flores com três sépalas e três pétalas bem definidas, sendo que uma delas modificada em labelo (TAKANE et al., 2010). Dentre essas espécies destaca-se a *Cattleya labiata*, que é uma espécie nativa do Nordeste brasileiro. Entretanto devido à ação antrópica representada principalmente pela coleta predatória e pela destruição de seu habitat, foi incluída, pelo Ministério do Meio Ambiente, na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, juntamente com outras 33 orquidáceas (BRASIL, 2008).

O aperfeiçoamento de técnicas para o cultivo *in vitro* dessas espécies ameaçadas é de fundamental importância para a domesticação, propagação massiva e introdução de plantas em seu habitat.

Considerando a dificuldade de multiplicação de orquídeas via sementes, por conta da demora e da necessidade da presença de fungos micorrízicos (que fornecerão elementos nutritivos essenciais à plântula na germinação) (CAMPOS, 2004), faz-se necessário a germinação e o cultivo *in vitro*.

Devido ao sucesso dessa aplicação prática a micropropagação está sendo cada vez mais empregada para fins comerciais, uma vez que o setor comercial de flores e plantas ornamentais vem demandando um grande número de mudas uniformes e de alta qualidade genética e fitossanitária durante o ano todo (CARVALHO et al., 2013).

A aplicação dessas técnicas no cultivo de orquídeas encontra-se amplamente difundida entre os laboratórios de cultura de tecidos, em que a principal vantagem consiste na produção de mudas em quantidade e qualidade. Além disso, alcança praticamente um valor de

100% de sementes germinadas, sendo possível a produção de mudas livres de doenças e a garantia da preservação das características da planta matriz (FARIA et al., 2012).

A cultura de tecidos requer a análise de alguns parâmetros, tais como explantes, assepsia, meio nutritivo, luminosidade e outros, os quais são importantes na compreensão do trabalho *in vitro* (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

A presença ou ausência de luz, sua qualidade e intensidade, bem como fatores relacionados com o fotoperíodo são extremamente importantes no desenvolvimento vegetal.

Na ausência de luz, o estiolamento consiste no desenvolvimento de brotos geralmente alongados e com coloração amarelada ou esbranquiçada, por conta da ausência do pigmento fotossintético, a clorofila (HARTMANN; KESTER, 1990). Suzuki et al. (2004) afirmam que orquídeas da espécie *Catasetum fimbriatum* apresentam estiolamento caulinar quando estioladas *in vitro*, podendo os segmentos nodais oriundos desse processo serem utilizados para a propagação vegetativa.

O estiolamento tem sido usado com sucesso na micropropagação de outras espécies ornamentais cultivadas. Em abacaxizeiro (*Ananas comosus*) var. *ananassoides*, Dias et al. (2011b) obtiveram resultados satisfatórios, utilizando meio MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), e os maiores brotos estiolados foram produzidos na ausência de reguladores de crescimento. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, na ausência de luz, Pinheiro et al. (2009) obtiveram bons resultados no número de brotos de antúrio (*Anthurium andraeanum*) var. IAC Eidibel em meio MS. Esses pesquisadores verificaram ainda que a não adição das auxinas AIA, AIB e ANA ao meio de cultura, foi mais adequada para a indução ao estiolamento *in vitro* dessa variedade de antúrio.

Diante da necessidade de se obter métodos alternativos para a propagação de espécies nativas ameaçadas de extinção e a escassez de estudos com a utilização de reguladores de crescimento no estiolamento *in vitro*, objetivou-se avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e de concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA no estiolamento *in vitro* de *Cattleya labiata*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza-CE, no período de maio a outubro de 2013.

A espécie vegetal estudada foi a orquídea *Cattleya labiata* Lindl. O material vegetal utilizado foram plântulas advindas de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação de um orquidário do município de Guaramiranga-CE. As sementes foram germinadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

Durante a germinação, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes, intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 24 ± 2 °C em meio MS até a instalação do experimento. Para uniformizar o material vegetal fez-se, então, uma seleção das plântulas mais desenvolvidas, com aspecto vigoroso e com coloração verde escura, contendo de 3 a 4 folhas. Essas, em câmara de fluxo laminar, tiveram seu tamanho padronizado pelo corte da parte apical ($1,0 \pm 0,2\text{cm}$), desprovidas de raízes, sendo inoculadas em tubos de ensaio (de dimensões de 150 mm x 25 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS nas mesmas condições da fase de germinação *in vitro* (Figura 1).

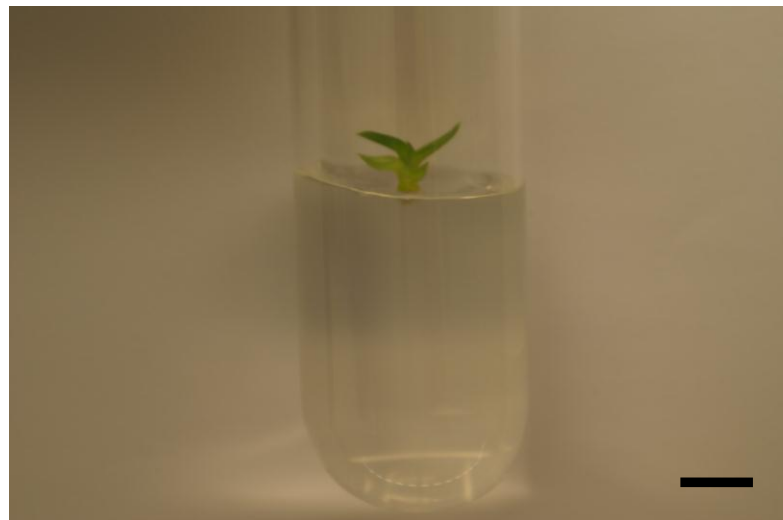


Figura 1 – Explante utilizado no estudo: plântula de *Cattleya labiata* Lindl. em tubo de ensaio contendo meio MS. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013 Barra = 1,0cm.

O ambiente de cultivo foi uma sala de crescimento com as mesmas condições da fase de germinação *in vitro*. Para a indução do estiolamento, parte das plântulas foi mantida também nessa sala de crescimento, mas sob ausência de luz, mantendo-se a mesma temperatura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em cinco tubos contendo um explante/tubo e analisado em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (dois ambientes x três doses de BAP x três doses de ANA), totalizando 72 parcelas e 18 tratamentos. A unidade experimental utilizada foi de um tubo de ensaio com um explante. Os tratamentos foram constituídos pelo meio MS adicionado com três diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹); três concentrações de ANA (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (presença e ausência de luz).

As avaliações foram realizadas ao final de 150 dias de cultivo *in vitro*, quando foram avaliados: número de brotos estiolados por explante, comprimento da brotação principal (cm), número de nós por broto estiolado, número de raízes e massa seca total (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar® - Sistema de análise de variância (FERREIRA, 2008) e as médias comparadas pelo teste F, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à concentração dos reguladores de crescimento, observa-se que todas as variáveis foram significativas a 1% para o ambiente (AMB) e suas interações com 6-benzilaminopurina (BAP) e com ácido naftaleno acético (ANA). Apenas a variável comprimento da brotação principal (CBP) diferenciou-se das demais doses da citocinina BAP e todas as variáveis, com exceção do número de nós pro broto (NN/B), mostraram diferenças entre as doses de ANA, notou-se ainda que não houve diferença significativa na interação entre os reguladores de crescimento BAP e ANA, nem na interação tripla com o fator ambiente em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância e coeficientes de variação (CV) para número de brotos estiolados por explante (NB/E), número de nós por broto estiolado (NN/B), comprimento da brotação principal (CBP), em cm, número de raízes (NR) e massa seca total, em g (MST) das plântulas de *Cattleya labiata* cultivadas em diferentes doses de BAP e ANA na presença e ausência de luz aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

Fonte de variação	GL	QM				
		NB/E	NN/B	CBP	NR	MST
Ambiente (AMB)	1	9,58**	1296,81**	16,86**	742,00**	0,0487**
BAP (BAP)	2	0,03 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,86*	0,03 ^{ns}	0,0000 ^{ns}
ANA (ANA)	2	7,95**	0,30 ^{ns}	1,04**	4,27**	0,0046**
AMB x BAP	2	9,49**	1,25**	2,17**	1,61**	0,0018**
AMB x ANA	2	7,84**	1,26**	5,11**	4,24**	0,0028**
BAP x ANA	4	0,06 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,0000 ^{ns}
AMB x BAP x ANA	4	0,05 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,0000 ^{ns}
Resíduo	54	0,48	0,36	0,18	0,30	0,0000
CV (%)		29,04	25,00	16,96	30,62	14,36

GL = Grau de liberdade; CV= Coeficiente de variação; QM= Quadrado médio; * e ** Significativo a 0,05 e a 0,01 de probabilidade, respectivamente; ^{ns} - não significativo pelo teste F

Após o período de cultivo *in vitro*, observou-se que a grande maioria das plântulas que estavam na condição de ausência de luz mostravam características típicas de plantas estioladas e aclorofiladas, como caules esbranquiçados e translúcidos, folhas pequenas, cujos limbos não se expandiram, e maior distanciamento da região dos entrenós (Figura 2A). As plântulas produziram brotações em suas bases ou a partir dos nós, sendo que estas brotações também apresentavam o fenótipo de plantas estioladas comuns do processo de escotomorfogênese. Taiz e Zeiger (2013) relatam que a ocorrência dessas características, em plantas cultivadas no escuro, por um longo período, se deve a inibição no desenvolvimento dos pró-plastídeos que, sem o estímulo luminoso, ao invés de se tornarem cloroplastos se desenvolvem em estioloplastos, os quais não sintetizam as enzimas e os pigmentos fotossintéticos necessários à maquinaria fotossintética.

As culturas que estavam nas salas de crescimento em ambiente com luz artificial apresentaram um desenvolvimento fotossintético normal, observado pela coloração esverdeada, quando comparadas às estioladas. Não houve o crescimento de nós viáveis para a separação, uma vez que os mesmos se apresentavam muito curtos, nas plântulas cultivadas em luz artificial e apenas novas folhas surgiram do explante inicial (Figura 2B).

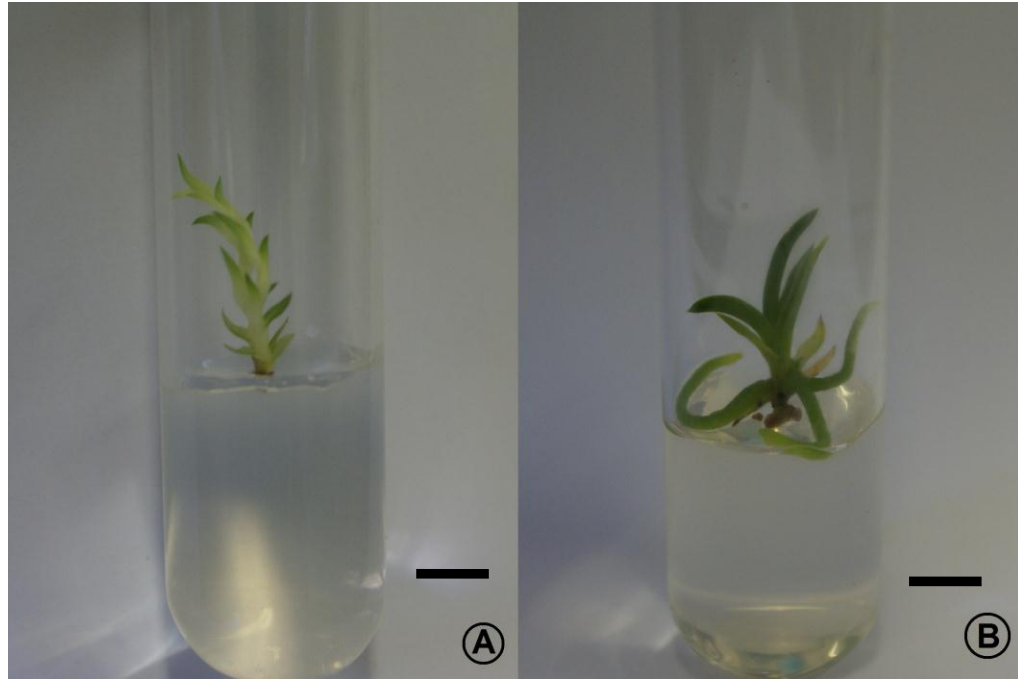


Figura 2 - Plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. cultivadas em ausência de luz (A) e na presença de luz (B), aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013. Foto: Anderson Rodrigues. Barras = 1,0cm.

O número de brotos estiolados foi superior na maioria das concentrações dos reguladores de crescimento nos explantes desenvolvidos em ambiente escuro (Tabela 2A). Analisando-se o ambiente de cultivo na presença de luz, não houve diferença para as concentrações de ANA; entretanto, observou-se significância para as concentrações de BAP, e a dosagem de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ao meio de cultura mostrou-se benéfica, obtendo-se em média 2,11 brotos. Em relação ao ambiente de cultivo na ausência de luz, para o fator BAP, a utilização de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ proporcionou o maior número de brotos (2,36), já para o fator ANA maiores resultados foram obtidos com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (2,51 brotos) (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de brotos estiolados por explante, número de nós por broto estiolado e comprimento da brotação principal em *Cattleya labiata* em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA, aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

(A) Número de brotos estiolados por explante								
Ambiente	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	1,64bB	2,11aA	1,38bB	1,71B	1,74aB	1,77aB	1,68aB	1,73B
Escuro	2,21aA	1,97aB	2,36aA	2,18A	1,97bA	2,51aA	2,28aA	2,25A
Médias	1,93b	2,04a	1,87b		1,86b	2,14a	1,98a	

(B) Número de nós por broto estiolado								
Ambiente	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B
Escuro	3,98aA	3,79bA	3,93aA	3,90A	3,82bA	3,74bA	3,97aA	3,84A
Médias	1,99a	1,90b	1,97a		1,91b	1,87b	1,99a	

(C) Comprimento da brotação principal (cm)								
Ambiente	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	1,90aB	1,97aB	1,86aB	1,91B	1,87aA	1,84abB	1,68bB	1,80B
Escuro	2,65aA	2,16bA	2,22bA	2,34A	1,96bA	2,09bA	2,64aA	2,23A
Médias	2,20a	2,06b	2,05b		1,92b	1,97b	2,16a	

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O aumento da concentração de BAP no meio de cultura não foi vantajoso para a obtenção de brotações de *Cattleya labiata*. Ramos e Carneiro (2007) e Soares et al. (2010), os quais trabalhando com *Cattleya x mesquiae* e *Laelia crispata*, respectivamente, obtiveram aumento de brotações na ausência de BAP. Suzuki et al. (2004) constataram que o nível endógeno de citocininas em ambiente na ausência de luz é maior do que em ambiente na presença de luz em *Cattleya fimbriatum*. Esse fenômeno também pode ter ocorrido com os explantes utilizados de *Cattleya labiata* cultivados em ambiente escuro. Pode ter ocorrido aumento excessivo do nível endógeno dessa citocinina resultante da adição do BAP no meio de cultura. A adição de ANA no meio de cultura, no escuro, mostrou-se vantajosa para uma boa produção de brotos nos explantes, pois possivelmente proporcionou uma relação auxina/citocinina que

direcionou o metabolismo vegetal para a produção de brotações ao invés de crescimento. A adição de BAP também proporcionou um aumento no número de brotos estiolados, quando utilizada na menor concentração, de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ambiente na presença de luz.

No número de nós por broto estiolado, a adição de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA ao meio de cultura na ausência de luz proporcionou um significativo aumento desta variável (Tabela 2B). Na micropropagação de *Cattleya x mesquita*, Ramos e Carneiro (2007) obtiveram uma média de 3,72 nós/broto nessas mesmas condições com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e no escuro. Nem todos os nós produzidos nos explantes apresentavam brotações, o que leva a crer que, se houvesse a continuidade do cultivo *in vitro* em ausência de luz, as gemas axilares presentes nos nós provavelmente originariam brotações, tornando-se novas fontes de explantes.

No presente trabalho as maiores produções de nós com o uso de BAP foram obtidas com a dose de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ e na sua ausência ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$), produzindo respectivamente 3,93 e 3,98 nós/broto. Estes resultados corroboram parcialmente com os obtidos por Soares et al. (2010), em que na ausência da citocinina BAP observou-se a maior produção média de nós/broto (7,31) em *Laelia crispata*. A não adição de reguladores de crescimento para a característica em questão mostra-se vantajosa na diminuição dos custos de produção, para obtenção de mudas micropropagadas. Ainda em relação ao número de nós por broto estiolado é interessante verificar que na luz, os brotos estiolados não apresentaram nós, mesmo com a adição de BAP e de ANA ao meio de cultura.

O comprimento da brotação principal das plântulas variou entre ambientes em cada um dos reguladores de crescimento, e a altura foi maior no ambiente com ausência de luz (Tabela 2C). Observa-se que o BAP ocasiona um efeito negativo se comparado com o meio sem a adição dessa citocinina no escuro, o que foi representado pela queda nos valores médios do comprimento a medida que a concentração desse regulador de crescimento se eleva. Para o fator ANA, observou-se efeito positivo no aumento da concentração dessa auxina no meio de cultura em ambiente escuro, obtendo-se, com a dose de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, em média 2,64 cm de comprimento.

O comportamento observado para o comprimento das brotações pode ser atribuído à capacidade que as citocininas possuem em modificar a dominância apical e promover o crescimento das gemas laterais (TAIZ; ZEIGER, 2013). Mok et al., (2000) comentaram que, acrescentando o BAP, ocorre quebrar na dominância apical, favorecendo a emissão de novas brotações.

Estudos feitos por Dias et al. (2011a) demonstraram que o incremento de BAP no meio de cultura causou redução no comprimento das brotações de *Ananas comosus* var. *ananassoides*, fato esse também observado neste trabalho, em que a adição de BAP proporcionou uma diminuição no comprimento das brotações em ambiente sob ausência de luz. O efeito da adição de ANA mostrou resultados contrários, constatado pelo maior comprimento das brotações com o aumento das dosagens em ambiente sob ausência de luz.

Por outro lado, não se observou diferenças na utilização de distintas concentrações de BAP no meio de cultura em ambiente luminoso e o aumento nas doses de ANA não foi vantajoso para o crescimento, na presença de luz, produzindo menor número de nós. Moreira et al (2003) afirmam que o comprimento da brotação principal é uma variável importante, uma vez que ela está diretamente relacionada com o número de nós que serão formados nas novas brotações, quando forem colocadas em ambiente luminoso.

Suzuki et al. (2004) obtiveram mudas de maior tamanho de *Catsetum fimbriatum*, quando estas foram mantidas sob ausência de luz em detrimento ao ambiente luminoso, independentemente dos reguladores de crescimento e das dosagens utilizadas.

Em relação ao número de raízes, a interação entre doses de ANA e o ambiente foi significativa pelo teste F (Tabela 3). O maior número de raízes foi obtido na interação 2,0 mg L⁻¹ de ANA em ambiente com presença de luz, com uma produção média de 3,32 raízes, enquanto que em ambiente escuro e com a mesma dose da auxina, a produção média foi de 1,26 raízes.

Tabela 3 – Número de raízes e massa seca total em *Cattleya labiata* em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

(A) Número de raízes								
Ambiente	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	2,42aA	2,35aA	2,17bA	2,31A	2,44bA	2,98abA	3,32aA	2,91A
Escuro	0,34aB	0,45aB	0,38aB	0,39B	0,79bB	0,85bB	1,26aB	0,97B
Médias	1,38a	1,40a	1,28b		1,62c	1,92b	2,29a	

(B) Massa seca total (g)								
Ambiente	BAP (mg L ⁻¹)			Médias	ANA (mg L ⁻¹)			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	0,023cA	0,031bA	0,041aA	0,032A	0,018bA	0,036aA	0,039aA	0,031A
Escuro	0,008aB	0,009aB	0,008aB	0,008B	0,007aB	0,008aB	0,009aB	0,008B
Médias	0,016c	0,020b	0,025a		0,013b	0,022a	0,024a	

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na micropropagação de *Ananas comosus*, Piza et al. (2001) constataram que o meio de cultura adicionado com a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de ANA mostrou-se favorável no enraizamento desta espécie.

A concentração normalmente utilizada de ANA nas diferentes espécies vegetais é abaixo de 0,5 mg L⁻¹, entretanto podem haver divergência entre os resultados dos trabalhos devido as diferenças genéticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Isto se deve ao fato de que as espécies vegetais respondem de maneira diferenciada à aplicação de reguladores de crescimento em função do teor endógeno de auxina/citocinina (DIAS et al., 2011b).

Em relação ao número de raízes: ambos os controles demonstraram que a luz favorece ao enraizamento *in vitro* em *Cattleya labiata*. Na presença de luz, a maior concentração de BAP testada, teve efeito negativo no número de raízes formadas. Já nessas mesmas condições, a adição de ANA ao meio de cultura favoreceu maior rizogênese.

As auxinas e as citocininas possuem efeitos contrários na rizogênese das culturas *in vitro* em ambientes na presença de luz, enquanto uma maior concentração de auxinas favorece a formação das raízes, uma maior concentração de citocininas inibe-a (LEMOS, 2010).

A massa seca total apresentou diferenças significativas entre os fatores das interações entre doses de BAP x Ambiente e doses de ANA x Ambiente, onde os melhores acréscimos de massa seca foram observados nos tratamentos que continham a maior concentração dos reguladores de crescimento em ambiente luminoso. As doses de 4,0 mg L⁻¹ de BAP e de 2,0 mg L⁻¹ de ANA promoveram um incremento na biomassa de 0,041g e 0,039g, respectivamente (Tabela 3B).

Scheidt et al. (2009), que avaliando o incremento de massa seca total de *Oncidium leuchochilum* no meio nutritivo MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de ANA em ambiente na presença de luz, obteve plântulas com média de 0,45g de massa seca total.

Souto et al. (2010), que estudando os efeitos do ácido naftaleno acético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* obteve médias aproximadas de 0,025g de massa seca nas plântulas desta espécie com o uso de 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

Mitra e Bose (1991) afirmam que as espécies e variedades apresentam respostas variadas e diferenciadas entre si com relação à utilização de reguladores de crescimento.

As plântulas cultivadas em ambiente na presença de luz apresentaram médias superiores de massa seca total em todas as concentrações, independentemente do regulador de crescimento, se comparadas com as cultivadas no escuro.

Não houve aumento da massa das mudas com a adição tanto de BAP quanto de ANA, ao meio de cultura, quando as culturas foram desenvolvidas em ambiente na ausência de luz. Já o contrário foi constatado nas culturas mantidas sob a luz, tanto a adição de BAP quanto de ANA, ao meio de cultura, promoveram aumento na massa seca das mudas.

Essas observação ressaltam o papel essencial do processo fotossintético na obtenção de energia e na formação de esqueletos de carbono necessários para o crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013), enquanto que o estiolamento consiste num mecanismo evolutivo em que a energia contida nos tecidos vegetais da planta é utilizada no alongamento como uma estratégia adaptativa na busca pela luz (KERBAUY; CHAER, 2011). No primeiro processo ocorre o crescimento vegetal de forma organizada de todos os órgãos em largura e comprimento, enquanto que no estiolamento o crescimento do caule em comprimento é prioritário em detrimento da largura e as folhas são pequenas e pouco desenvolvidas resultando em uma menor quantidade de massa seca se comparada com as plântulas cultivadas em ambiente luminoso.

4 CONCLUSÕES

O número de nós obtidos por meio do estiolamento de segmento nodais de plântulas é vantajoso para a produção de brotos *in vitro* de orquídeas da espécie *Cattleya labiata*.

O número de brotos estiolados em plântulas de *Cattleya labiata* foi superior no ambiente em ausência de luz, com a utilização de 4,0 mg L⁻¹ de BAP e em sua ausência (0,0 mg L⁻¹); e com o uso de 1,0 mg L⁻¹ e de 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

A adição de ANA, ao meio de cultura, é importante para a indução ao estiolamento *in vitro* de segmentos caulinares de orquídea (*Cattleya labiata*) visto que proporcionou os melhores valores para número de nós, comprimento da brotação principal e número de raízes.

A adição de 4,0 mg L⁻¹ de BAP e 2,0 mg L⁻¹ de ANA, ao meio de cultura, incrementa de massa seca no cultivo *in vitro* de orquídea (*Cattleya labiata*), quando as culturas se desenvolvem na luz.

5 REFERÊNCIAS

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 15-49.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente. **Instrução normativa de setembro de 2008**. Disponível em: < <http://www.estadao.com.br/ext/especiais/2008/09/extint.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

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

CARVALHO, A. C. P. P. de ; TOMBOLATO, A. F. C. ; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O.; SILVA, F. da. Panorama da Cultura de Tecidos no Brasil com ênfase em Flores e

Plantas Ornamentais. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2013, p. 13-53.

COSTA, M. A. P. de C.; BASTOS, M. J. S. M.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. de S. ; ALVES, R. M. de O. ; SOUZA, E. H. de; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídea. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2013, p. 373-392.

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, G. A.; SANTOS, V. A. dos. Reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 3, p. 383-390, 2011a.

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, G. A.; SANTOS, V. A. dos; OLIVEIRA, A. C.; RODRIGUES, V. A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011b.

FARIA, R. T; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. 1. ed. Mecenaz, Londrina, 2012, v. único. 124p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v.6, n.1, p.36-41, 2008.

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-CNPQ, 1998. p. 99-169.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagation de plantas: principios y practicas**. México, D. C.: Continental, 1990. 760 p.

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

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 103-127.

MITRA, S. K.; BOSE, T. K. Metabolic changes during adventitious root formation in ethrel and IBA treated cutting of litchi. **The Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 48, n. 2, p. 105-107, 1991.

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. ***In vitro Cellular & Developmental Biology Plant***, Columbia, v. 36, n. 1, p. 102-107, 2000.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. D. de; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n. 5, p.1002-1006, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473-497, 1962.

PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. de M. G.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROS, L. de M. Micropropagação de antúrio ‘IAC Eidibel’ por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.

PIZA, I. M. de T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 280, p. 681-690, 2001.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquithae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiás, v. 37, n. 1, p. 10-15, 2007.

SCHEIDT, G. N.; SILVA, A. L. L. da; DRONK, A. G.; BIASI, L. A.; ARAKAKI, A. H.; SOCCOL. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 82-85, 2009.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAÚJO, A. G. de. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1941-1947, 2010.

SOUTO, J. de S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. de M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, R. M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n. 2, p. 179-185, 2010.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013, 918 p.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza: UFC. 2010. 179 p.

CAPÍTULO 3 – ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE *Phalaenopsis* sp.

RESUMO

O gênero *Phalaenopsis* está entre as orquídeas mais populares, abrangendo plantas epífitas muito duráveis e originárias das regiões tropicais e subtropicais do planeta. Sua propagação comercial se dá por cultura de tecidos e o desafio atual consiste na redução de custos de produção em larga escala a partir de diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. O estiolamento *in vitro* permite a obtenção de segmentos nodais em muitas espécies de plantas. Em razão disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e de concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) no estiolamento *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente $\pm 1,0$ cm de comprimento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15,0 mL de meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), ANA (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ambientes de cultivo (sala de crescimento no escuro e com 16 horas de luz artificial), em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (2 ambientes de cultivo x 3 doses de BAP x 3 doses de ANA). Ao final de 150 dias, foram realizadas as seguintes avaliações: a) número de brotos estiolados; b) número de nós por broto estiolado; c) comprimento da brotação principal (cm); d) número de raízes e, e) massa seca total (g). O número de brotos estiolados foi maior em ambiente luminoso e com o uso de 2,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹ de BAP. O número de nós por broto estiolado foi superior no ambiente em ausência de luz independente da concentração de ANA utilizada. A espécie apresentou maior número de nós por broto estiolado com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Diferenças foram observadas para a altura da brotação principal, que foi superior em ambiente escuro e, em contraste, o número de raízes e a massa seca total das culturas foram superiores em ambiente luminoso. O estiolamento de plântulas mostra-se relevante na produção de brotações *in vitro* desse gênero.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultura de tecidos, presença e ausência de luz, 6-benzilaminopurina, ácido naftaleno acético.

***IN VITRO* ETIOLATION OF *Phalaenopsis* sp.**

ABSTRACT

The genus *Phalaenopsis* is among the most popular orchids, covering epiphytes plants very durable and originating in tropical and subtropical regions of the planet. Its commercial propagation occurs by tissue culture and the current challenge is to reduce costs of large-scale production from different techniques of *in vitro* culture. The *in vitro* etiolation allows obtaining of nodal segments in many plant species. For this reason, this study aimed to evaluate the influence of different cultivation environments and concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) and NAA (naphthalene acetic acid) *in vitro* etiolation of the orchids *Phalaenopsis* sp. Seedlings grown from seeds *in vitro* germinated with approximately ± 1.0 cm in length were inoculated into test tubes containing 15.0 mL of MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0.0, 2.0 and 4, 0 mg L⁻¹), NAA (0.0, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and culture environments (dark and 16 h artificial lighted growth room) in a factorial 2 x 3 x 3 (2 environments x 3 doses of BAP x 3 doses of NAA). At the end of 150 days, the following evaluations were performed: a) etiolated shoot number; b) number of nodes per etiolated shoot; c) length of the main shoot (cm); d) root number, and e) total plant dry mass (g). The number of etiolated shoots was higher in lighted environment and using 2.0 mg L⁻¹ and 4.0 mg L⁻¹ of BAP. The number of nodes per etiolated shoot was higher in environment in the absence of light independent of the concentration of NAA used. The species showed a higher number of nodes per etiolated shoot with the use of 1.0 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹ of NAA. Differences were observed for the height of the main shoot, which was higher in environment in the absence of light, and in contrast, root number and total plant dry weight were superior in luminous environment. The seedlings etiolation shows to be relevant in producing *in vitro* shoot this genre.

Keywords: Orchidaceae, tissue culture, presence and absence of light, 6-benzylaminopurine, naphthalene acetic acid.

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam um lento desenvolvimento, o que requer um maior período de cultivo antes de irem para a comercialização se comparado às outras espécies de plantas ornamentais. Tal fato também contribui para o elevado valor unitário dessas plantas no mercado, o que tem despertado o interesse dos produtores em reduzir o tempo para a formação de mudas de orquídeas, visando a diminuição dos custos de produção (VICHATO et al., 2007).

As espécies do gênero *Phalaenopsis* são plantas originárias dos trópicos e subtropicais, sendo atualmente muito populares entre as orquídeas devido ao fato de seu ciclo de produção ser relativamente curto se comparado com outras espécies de orquídeas e, além da longa durabilidade de suas flores. Apresentam grande variedade de cores, formatos e tamanhos, conferindo a esta espécie ornamental um alto potencial comercial (LEE; GERALD, 2011).

As orquídeas são propagadas tanto por via sexuada quanto assexuada. Os métodos convencionais de propagação apresentam baixo rendimento, já o cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido uma excelente alternativa a ser empregada para a propagação das orquídeas. Dentre as vantagens estão a multiplicação rápida e eficiente para a obtenção de um grande número de plantas com alta qualidade fitossanitária em pequenos espaços e em curto período de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dessa forma, a cultura *in vitro* de células e tecidos de orquídeas supre de forma satisfatória a demanda do mercado consumidor e também atua como um poderoso instrumento de preservação do meio ambiente, por diminuir a extração dessas plantas na natureza, sendo, portanto uma importante ferramenta na produção de mudas (FARIA et al, 2012).

Considerando a dificuldade na multiplicação sexuada das orquídeas de forma natural, devido à dependência de fungos simbióticos, faz-se necessária a germinação *in vitro* de suas sementes (GIMENES, 2013).

Existem muitas variáveis que podem ser ajustadas, na cultura de tecidos, para a obtenção de um maior número de mudas, como o número de brotos ou número de nós. O sucesso na prática da cultura de tecidos se deve ao requerimento nutricional das células e tecidos, o tipo de explante, o genótipo, o processo de aclimatização e as condições ambientais (FARIA et al., 2002).

Dentre as condições de cultivo, a presença ou ausência de luz, sua qualidade e intensidade, bem como o fotoperíodo são de extrema importância no desenvolvimento vegetal ao longo do ano, pois propiciam informações ambientais e climáticas importantes à planta (VON ARNIN; DENG, 1998).

A ausência de luz promove o desenvolvimento de brotos, ramos ou partes desses, o que acarreta no processo de estiolamento, geralmente produzindo plantas alongadas e com coloração amarela ou branca, por conta da falta do pigmento clorofila (HARTMANN; KESTER, 1990). O aumento da suculência também é uma característica geralmente observada em culturas estioladas (MAYNARD; BASSUK, 1996). Além disso, esse método apresenta um maior distanciamento entre os entrenós, proporcionando um aumento no número de brotações por explante (PRAXEDES et al., 2001).

Dentre os grupos de reguladores de crescimento empregados na cultura de tecidos, destacam-se as auxinas e as citocininas (CALDAS et al., 1998). A auxina é a classe de reguladores de crescimento vegetal relacionada com a estimulação da expansão celular e principalmente indução do enraizamento em segmentos de plantas, enquanto o papel das citocininas está na promoção da divisão celular (PASQUAL, 2004) e são indispensáveis na quebra da dominância apical e na proliferação de gemas axilares (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

O efeito das citocininas é mais pronunciado no cultivo *in vitro* quando são utilizadas juntamente com auxinas (PASQUAL, 2001). Dentre as auxinas sintéticas, o ácido naftaleno acético (ANA) é o mais utilizado, e dentre as citocininas, o 6-benzilaminopurina (BAP) é o que geralmente apresenta melhores resultados (PASQUAL et al., 2008).

Diante da crescente demanda por flores e plantas ornamentais tropicais e da escassez de estudos com a utilização de reguladores de crescimento no estiolamento *in vitro* de orquídeas, objetivou-se avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e de concentração dos reguladores de crescimento BAP e ANA no estiolamento *in vitro* de *Phalaenopsis* sp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza-CE, no período de maio a outubro de 2013.

O gênero vegetal estudado foi o *Phalaenopsis* sp. (Figura 1). A planta, oriunda do Orquidário da Universidade Federal do Ceará, a partir da qual foram retiradas as cápsulas, possuía inflorescências brancas com labelo levemente alaranjado, crescimento monopodial e altura média de 55 cm com folhas ovaladas e suculentas.



Figura 1 - Aspectos da flor de *Phalaenopsis* sp., espécie usada no estudo. Foto: Roberto Jun Takane.

Durante a germinação, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ no meio MS até a instalação do experimento. Para uniformizar o material vegetal fez-se, então, uma seleção das plântulas mais desenvolvidas, com aspecto vigoroso e com coloração verde escura, contendo de 3 a 4 folhas. Essas, em câmara de fluxo laminar, tiveram seu tamanho padronizado pelo corte da parte apical ($1,0 \pm 0,2\text{cm}$), desprovidas de raízes, sendo inoculadas em tubos de ensaio (de dimensões de 150

mm x 25 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS nas mesmas condições da fase de germinação *in vitro* (Figura 1).

O ambiente de cultivo foi uma sala de crescimento com as mesmas condições a fase de germinação *in vitro*. Para a indução do estiolamento, parte das plântulas foi mantida também nessa sala de crescimento, mas sob ausência de luz, mantendo-se a mesma temperatura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em cinco tubos contendo um explante/tubo e analisado em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (dois ambientes x três doses de BAP x três doses de ANA), totalizando 72 parcelas e 18 tratamentos. A unidade experimental utilizada foi de um tubo de ensaio com um explante. Os tratamentos foram constituídos pelo meio MS adicionado com três diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹); três concentrações de ANA (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (presença e ausência de luz).

As avaliações foram realizadas ao final de 150 dias de cultivo *in vitro*, quando foram avaliados: número de brotos estiolados por explante, comprimento da brotação principal (cm), número de nós por broto estiolado, número de raízes e massa seca total (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar® - Sistema de análise de variância (FERREIRA, 2008) e as médias comparadas pelo teste F, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de variância, observa-se que todas as variáveis foram altamente significativas para o fator Ambiente (Tabela 1). A variável número de brotos estiolados por explante (NB/E) foi altamente significativa para a interação entre Ambiente e 6-benzilmaminopurina (BAP); e número de nós por broto estiolado (NN/B) foi significativa para a interação Ambiente e ANA. Apenas a variável número de raízes (NR) mostrou-se altamente significativa para a interação entre as doses de BAP e de ácido naftaleno acético (ANA). Todas as variáveis, com exceção de comprimento da brotação principal (CBP) e massa seca total (MST), mostraram diferenças significativas entre as doses de BAP. A análise mostra ainda que não houve diferença significativa na interação tripla entre os fatores Ambiente, dose de BAP e doses de ANA.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância e coeficientes de variação (CV) para número de brotos estiolado por explante (NB/E), número de nós por broto estiolado (NN/B), comprimento da brotação principal (CBP), número de raízes (NR) e massa seca total (MST) das plântulas de *Phalaenopsis* sp. cultivadas em diferentes doses de BAP e ANA na presença e ausência de luz aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

Fonte de variação	GL	QM				
		NB/E	NN/B	CBP	NR	MST
Ambiente (AMB)	1	7,45**	18,13**	52,26**	3,56**	0,0013**
BAP (BAP)	2	12,21**	8,02*	0,09ns	5,89**	0,0000ns
ANA (ANA)	2	1,18ns	0,07ns	0,01ns	0,03ns	0,0000ns
AMB x BAP	2	5,48**	2,58ns	0,09ns	0,07ns	0,0000ns
AMB x ANA	2	2,07ns	6,35*	0,07ns	3,26ns	0,0000ns
BAP x ANA	4	6,22ns	2,56ns	0,08ns	0,87**	0,0000ns
AMB x BAP x ANA	4	5,56ns	0,49ns	0,06ns	0,41ns	0,0000ns
Resíduo	54	0,71	1,95	0,08	0,19	0,0000
CV (%)		28,48	30,41	14,27	23,89	22,21

GL = Grau de liberdade; CV= Coeficiente de variação; QM= Quadrado médio; * e ** Significativo a 0,05 e a 0,01 de probabilidade, respectivamente; ^{ns} - não significativo pelo teste F

Decorridos cento e cinquenta dias do cultivo *in vitro*, verificou-se que as plântulas cultivadas em ambiente com ausência de luz exibiam o caule alongado, esbranquiçado e translúcido com a formação de nós, entrenós e folhas bastante reduzidas (Figura 2A). Em cada um dos tratamentos surgiram novos brotos a partir da base ou dos nós, os quais também se apresentavam estiolados. George (1993a) afirma que no escuro, as plantas estioladas investem mais energia no alongamento rápido da parte aérea em detrimento da expansão foliar e da formação do sistema fotossintético. Essas características podem ser revertidas quando as plântulas são colocadas em ambiente na presença de luz, como verificado por Ramos e Carneiro (2007), que estudando estiolamento *in vitro* de *Cattleya x mesquitateae*, observaram que as culturas estioladas readquiriram as características de expansão, coloração esverdeada e o desenvolvimento normal quando retornaram às condições de luminosidade.

No ambiente na presença de luz, as plântulas apresentaram desenvolvimento fotossintético normal se comparadas às mantidas no escuro, devido à falta de clorofila. Não houve formação de nós e folhas pequenas surgiram do explante inicial (Figura 2B).

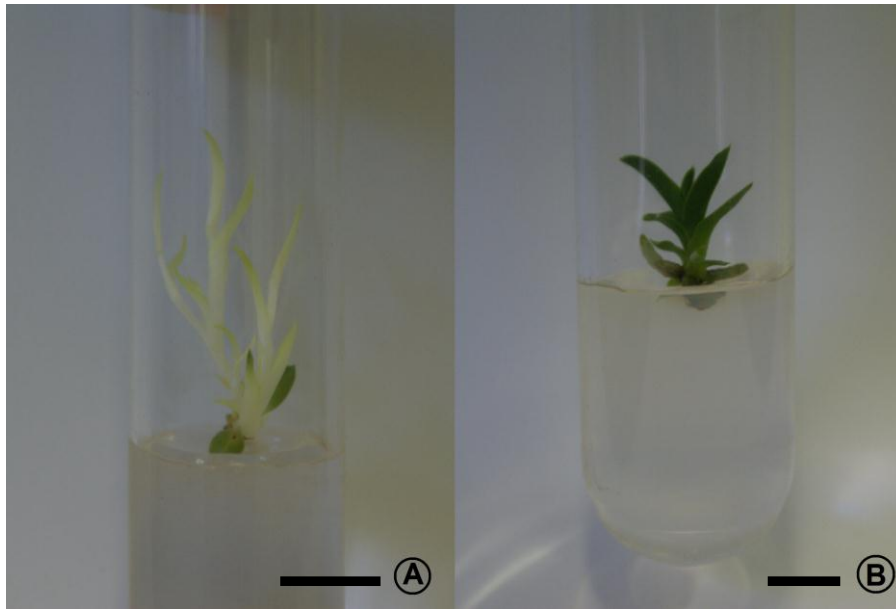


Figura 2 - Plântulas de *Phalaenopsis* sp. cultivadas em ausência de luz (A) e na presença de luz (B), aos 150 dias após o cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013. Foto: Anderson Rodrigues. Barras = 1,0 cm.

O número de brotos estiolados por explante de *Phalaenopsis* sp. foi superior em condições de luminosidade, com o acréscimo de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultivo mostrou-se vantajoso com uma produção média de 2,67 brotos por explante, não diferindo da concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, que apresentou uma média de 2,54 brotos/explante (Tabela 2A).

Tabela 2 - Número de brotos estiolados por explante e número de nós por broto estiolado em *Phalaenopsis* sp. em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz) sob a influência de concentrações de BAP e ANA, respectivamente, aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

Ambiente	(A) Número de brotos/explante				(B) Número de nós/ broto			
	BAP (mg L^{-1})			Médias	ANA (mg L^{-1})			Médias
	0	2	4		0	1	2	
Luz	2,21bA	2,67aA	2,54aA	2,47A	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00B
Escuro	1,93bB	2,19abB	2,39aA	2,17B	3,58bA	3,89aA	4,02aA	3,83A
Médias	2,07b	2,43a	2,47a		1,79b	1,95a	2,01a	

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Soares et al. (2010), que estudando o híbrido de orquídea [(*Laeliacattleya Culminant "Tuilerie" x Laeliacattleya Sons Atout Rotunda*) x *Bassolaelia Cattleya Startifire Moon Beach*] obtiveram maior produção de brotos em condições de ausência de luminosidade, nas mesmas concentrações de BAP testadas no presente trabalho, obtendo uma produção média de 2,86 brotos na concentração de 4,0 mg L⁻¹.

Segundo Suzuki et al. (2004) essas diferenças na capacidade proliferativa das diferentes espécies, em diferentes ambientes, pode estar associada à especificidade entre os genótipo e as concentrações de BAP. Por isso é importante o estudo das exigências fisiológicas de cada espécie, visando adequar o tipo de regulador de crescimento e sua melhor concentração a ser adicionado ao meio para cada genótipo.

O acréscimo da auxina sintética ANA, independente da concentração, no meio de cultura, em ausência de luz, proporcionou um aumento para número de nós por broto (Tabela 2B). Kerbauy (2011) afirma que ápices caulinares e gemas laterais possuem atividade meristemática apical indefinida, quando incubados no escuro, permitindo a formação contínua de nós e entrenós. Tal fato possibilita a formação de plantas diretamente das gemas laterais sem a passagem pela fase de calo, o que evita lesões na zona regenerativa, diminuindo o risco de ocorrências de variações genéticas de natureza desconhecida, as chamadas variações somaclonais (KISS et al., 1995).

Na ausência de luz, a melhor média (4,02) foi obtida com o uso da concentração de 2,0 mg L⁻¹ de ANA, não diferindo da concentração de 1,0 mg L⁻¹, com média de 3,89 nós/broto. Na micropropagação da orquídea *Laelia crispata*, Soares et al. (2010) obtiveram os melhores resultados com a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de ANA em ambiente escuro. Carvalho et al. (2005) obtiveram melhores resultados com abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) sem a adição de auxinas no meio de cultura. Essas respostas distintas podem estar relacionadas com as diferenças na sensibilidade às auxinas das diversas espécies que ocorrem com a separação dos nós pelo estiolamento (GEORGE, 1993b).

Os maiores comprimentos da brotação principal foram observados em ambiente na ausência de luz, atingindo média de 1,93 cm, enquanto que na luz esse valor foi de 1,21 cm (Tabela 3).

Soares et al. (2010) verificou em *Laelia crispata* e no híbrido [(*Laeliacattleya Culminant "Tuilerie" x Laeliacattleya Sons Atout Rotunda*) x *Bassolaelia Cattleya Startifire*

Moon Beach], que o crescimento em ambiente na ausência de luz foi maior que na ausência de luz. A diferença do crescimento entre ambientes diferentes é reflexo do processo de estiolamento, no qual a planta parece interagir na manutenção e controle da atividade de divisão celular nos caules em diferentes condições de luminosidade (KERBAUY, 2011).

Tabela 3 – Comprimento da brotação principal, número de raízes e massa seca total em *Phalaenopsis* sp. em diferentes ambientes de cultivo (presença e ausência de luz), aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013.

Ambiente	Comprimento da brotação principal (cm)	Número de raízes	Massa seca total (g)
Luz	1,21b	1,71a	0,014a
Escuro	1,93a	1,47b	0,009b

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O comprimento da brotação é uma variável muito importante, uma vez que está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações, quando colocados em ambientes luminosos (MOREIRA et al., 1999).

Com relação ao número de raízes e à massa seca total, maiores valores foram registrados em ambiente luminoso, com médias de 1,71 raízes e 0,014g de biomassa seca.

O melhor desempenho dessas variáveis em ambiente na presença de luz pode ser devido ao fato da luz prover condições ambientais favoráveis ao processo fotossintético, pelo qual a planta obtém energia necessária ao seu crescimento e desenvolvimento. Assim, a luz atua como um sinal que induz mudanças na plântula, de forma a facilitar o crescimento das raízes e capacita a planta para captura eficiente de energia luminosa e transformá-la em açúcares, proteínas e lipídeos necessários ao seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O número de raízes mostrou-se ainda significativo para a interação entre concentrações de BAP e de ANA. Na análise de regressão, o modelo matemático mais adequado foi o linear, com coeficientes de determinação de 0,9286; 0,9678 e 0,9964 para as doses de 0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de ANA, respectivamente (Figura 3).

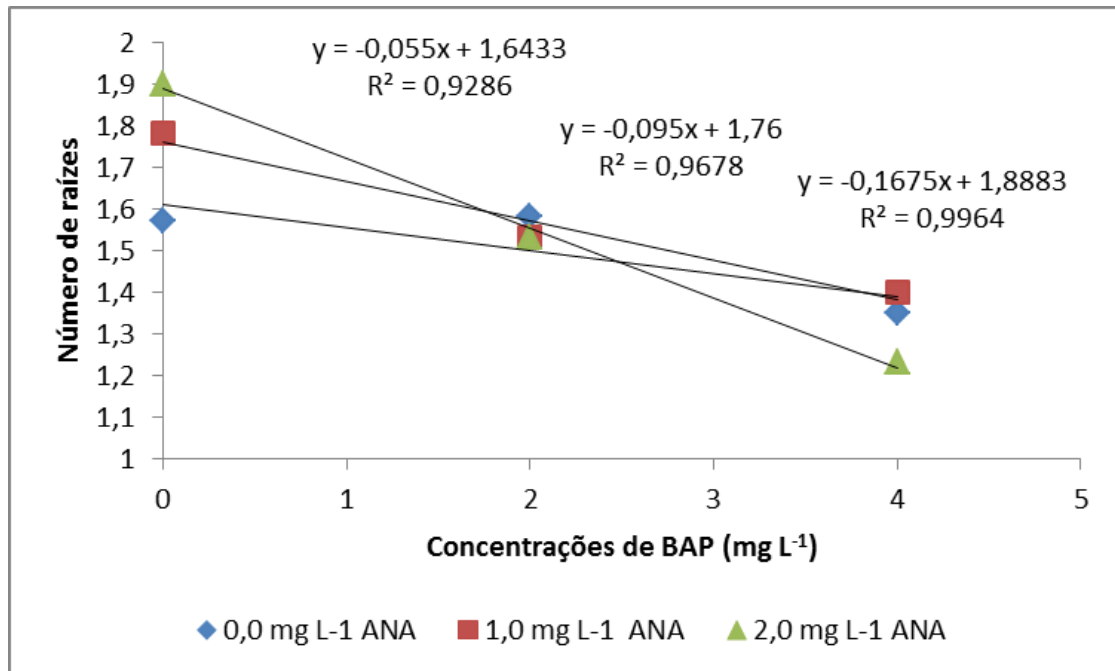


Figura 3 – Número de raízes em plântulas de *Phalaenopsis* sp., desenvolvidas em meio de cultura MS em função da concentração de BAP e ANA, aos 150 dias de cultivo *in vitro*. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, 2013

De um modo geral, o número de raízes decresce independente da concentração de ANA, quando a concentração de BAP aumenta, visto que os maiores valores dessa variável concentram-se na ausência de BAP. Barrueto Cid e Teixeira (2010) afirmam que ANA é utilizada na cultura de tecidos na indução de calos e no enraizamento; já o BAP tem uso difundido na indução de brotos, entretanto pode inibir a indução de raízes em culturas *in vitro*.

Dias et al. (2011), que estudando concentrações de reguladores vegetais no estiolamento de *Ananas comosus* var. *ananassoides*, verificaram maior número de raízes na ausência do regulador de crescimento BAP. No cultivo *in vitro* de macela (*Egletes viscosa*), Diniz et al. (2003) observaram que a adição de BAP promoveu uma redução no número de explantes com raízes.

As raízes são rotineiramente induzidas em resposta à aplicação de auxinas dentro de estratégias de regeneração de plantas e a formação desses órgãos pode ser regulada por maiores valores na relação auxina/citocinina (LEMOS, 2010).

4 CONCLUSÕES

O estiolamento de segmento nodais de plântulas é vantajoso para a produção de brotações *in vitro* de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*.

O número de brotos em plântulas de *Phalaenopsis* sp. foi superior no ambiente em ausência de luz, com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ ou mais de BAP e o número de nós por broto com 1,0 mg L⁻¹ ou mais de ANA.

O cultivo *in vitro* no escuro é necessário para a indução ao estiolamento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Phalaenopsis* sp.) visto que proporcionou os melhores valores para o comprimento da brotação principal.

A massa seca foi superior em ambiente na presença de luz no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis* sp.

A não adição de BAP, ao meio de cultura, é adequada para a formação de raízes no cultivo *in vitro* de orquídea (*Phalaenopsis* sp.) em ambiente na presença de luz.

5 REFERÊNCIAS

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 15-49.

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

CARVALHO, A. C. P. P. de, BRAGA, E. P., SANTOS, M. R. A. dos, MORAIS, J. P. S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) por meio da indução

ao estiolamento e regeneração de plântulas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 11, p. 121-126, 2005.

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, G. A.; SANTOS, V. A. dos; OLIVEIRA, A. C.; RODRIGUES, V. A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011.

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

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. 1. ed. Mecenas, Londrina, 2012, 124 p.

FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using in vitro propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

GEORGE, E. F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed., Edington: Exegetics, 1993a. p.183-230

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Techniques. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics Limited, 1993b. p. 576-638

GIMENES, R. **Pacloutrazol no crescimento e desenvolvimento de *Zygopetalum crinitum* Lodd. e *Cattleya schilleriana* Rchb.f. (Orchidaceae) durante as fases *in vitro* e de aclimatização**. 2013. 54 p. Tese. (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

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-CNPq, 1998. p. 99-169.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagation de plantas: principios y practicas**. México, D. C.: Continental, 1990. 760 p.

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

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

LEE, L. L.; GERALD, L. T. S. Biofábrica de *Phalaenopsis*. In: GERALD, L. T. S. (Orgs.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 149-175.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2010. v. 1, p. 103-127.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Stock plant etiolation, banding and shading effects on the histology of adventitious rooting in stems of *Carpinus betulus* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p.853-860, 1996.

MOREIRA, M. A.; SOBRINHO, A. dos A.; PASQUAL, M. Indução ao estiolamento '*in vitro*' de brotos de abacaxi cv. Pérola. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, n. 193, p. 193-197, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473-497, 1962.

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

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 106p

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.1, p.45-49, 2008.

PRAXEDES, S. C.; SILVA JÚNIOR, A. F.; FIGUEIREDO, F. L. B.; FIGUEIREDO, M. L.; CÂMARA, F. A. A.; OLIVEIRA, O. F. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró v. 14. n 1/2, p.13-15, 2001.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquita* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiás, v. 37, n. 1, p. 10-15, 2007.

SOARES, J. D. R; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAÚJO, A. G. de. Estiolamento e luz artificial no cultivo *in vitro* de orquídeas nativa e híbrida. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1941-1947, 2010.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 1, p. 929-935, 2004.

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

VON ARNIM, A.; DENG, S. W. Light control of seedling development. Annual Review of Plant Physiology. **Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p.215-243, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013, 918 p.