

# ORGANOGENESE *in vitro* A PARTIR DE GEMAS APICAIS E AXILARES DE PLANTAS ADULTAS DE ORQUÍDEAS DO GRUPO *Cattleya*<sup>1</sup>

Gizella Machado Ventura<sup>2</sup>  
José Maria Moreira Dias<sup>2</sup>  
Sílvio Lopes Teixeira<sup>3</sup>  
Virginia Silva Carvalho<sup>2</sup>  
Sérgio Yoshimitsu Motoike<sup>2</sup>  
Roberto Ferreira de Novais<sup>4</sup>  
Paulo Roberto Cecon<sup>5</sup>

## RESUMO

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares e gemas axilares é importante para uma rápida e eficiente propagação clonal. O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e de gemas axilares de *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* 'Alba', identificando o melhor tipo de explante para este híbrido. Ápices caulinares e gemas axilares foram retirados de brotações e bases de pseudobulbos de plantas adultas, após desinfestação. Estes explantes foram inoculados em meio de cultivo líquido com a formulação de Murashige e Skoog (1962), contendo 0,2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Após 50 dias e já com formação de estruturas, os explantes foram transferidos para meio de mesma composição, porém sólido, com carvão ativado e sem fitorreguladores. Os tratamentos foram três tipos de explantes: 24 ápices caulinares (AC), 19 gemas axilares de brotações (GB) e 10 gemas axilares de pseudobulbos (GP). O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado. Avaliaram-se a porcentagem de estruturas formadas, o aspecto fisiológico e a área final dos explantes. Os explantes GB foram os que apresentaram maior porcentagem de estruturas formadas (47,4%), seguidos dos GP (20%) e

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18.11.2002. Parte da tese de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa. E-mail: Gizella@vicosa.ufv.br

<sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, 36571-000 Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense. 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ.

<sup>4</sup> Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa.

<sup>5</sup> Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa.

AC (12,5%). O grau de oxidação dos explantes foi avaliado como totalmente oxidado (71,7%), oxidado com ápice verde (7,5%), verde com extremidade oxidada (7,5%) e verde expandido (13,2%). Os explantes GB apresentaram maior área final aos 50 dias de cultivo. Embora os três tipos de explantes apresentem alta porcentagem de oxidação, todos mostram boa capacidade morfogênica, principalmente as gemas axilares de brotações, potencializando uma técnica para propagação em escala comercial dessa espécie.

Palavras-chaves: *Laelia*, ápices caulinares, morfogênese *in vitro*

## ABSTRACT

### *In vitro* ORGANOGENESIS FROM TIP AND AXILLARY BUDS OF ADULT PLANTS OF ORCHIDS FROM *Cattleya* GROUP

The culture *in vitro* of shoot tips and axillary buds is important for a rapid and efficient clonal propagation. The goal of this work was to determine the morphogenic ability of shoot tips and axillary buds of *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* 'Alba', identifying the best kind of explants for this hybrid. Shoot tips and axillary buds were obtained from shoots and pseudobulb bases from adult plants after desinfestation. These explants were inoculated in a liquid culture medium with Murashige & Skoog (1962) formulation containing kinetin (0.2 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (1.0 mg L<sup>-1</sup>). After 50 days, already with the formation of structures, the explants were transferred to a similar, but solid, culture medium with activated charcoal and without growth regulators. The treatments were from three types of explants: 24 shoot tips (ST), 19 shoot axillary buds (SB) and 10 pseudobulb axillary buds (PB). The experiment was built on the completely random design. The percentage of explants regeneration and the physiological aspect were estimated, as well as the final explant area. SB explants were the ones to show the higher rate of regeneration (47.4%), followed by PB explants (20%) and ST ones (12.5%). The explants oxidation level was evaluated as fully oxidated tip (71.7%), oxidated with green tip (7.5%), green with oxidated tip (7.5%) and expanded green (13.2%). SB explants showed larger final area by the 50th day of growth. Although the three kinds of explants showed higher percentage of oxidation, all presented good morphogenic capability, specially the shoot axillary buds, making possible *in vitro* commercial propagation of this species.

Key words: *Laelia*, shoot tips, morphogenesis *in vitro*

## INTRODUÇÃO

O gênero *Laelia*, um componente do grupo *Cattleya* (3) e cuja maioria de suas espécies são autóctones do Brasil meridional (7), é muito utilizado na hibridação, em decorrência de sua excelente forma, cor e fragrância (3). Reinert e Mohr (12) já citavam, em seus trabalhos, os esforços dos fitomelhoristas que almejavam obter híbridos de orquídeas, apresentando flores com maior qualidade e novas tonalidades de cores.

Como resultado de cruzamentos, os híbridos de orquídeas constituem progênies desuniformes, em razão da elevada taxa de segregação gênica. Portanto, sua propagação via seminífera produzirá uma população heterogênea de plantas (10). A partir das progênies, é possível selecionar desde plantas com qualidade de alto padrão agrônômico até aquelas, em princípio, sem valor. Por isso, é importante que a propagação seja a partir de plantas adultas em que suas flores, produto final desejado, já tenham sido avaliadas segundo os padrões de qualidade. Assim, o recomendado é a utilização de processos de propagação vegetativa, com preferência pelos métodos de cultivo *in vitro*, por serem mais rápidos e de maior rendimento, se comparados com o principal método de propagação vegetativa desta planta, que é o de divisão de touceiras (12).

As orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas *in vitro* em escala comercial (11). Embora explantes possam ser obtidos de distintas partes da planta-matriz, as gemas axilares e ápices caulinares são os tipos de explantes mais utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas, por possibilitar a limpeza clonal, a conservação e o intercâmbio de germoplasma (6), além de manter a uniformidade, estabilidade e identidade genotípicas (10).

Segundo revisão realizada por Arditti e Ernst (1), os referidos tipos de explantes são geralmente extraídos da base de brotações laterais em crescimento, com 1 a 15 cm de comprimento, ou de pseudobulbos e rizomas de plantas adultas. Não obstante, quando os explantes procedem de plantas cultivadas a céu aberto ou em casa de vegetação, é necessária a utilização de um eficiente método de desinfestação da planta-matriz e dos explantes dela extraídos, para assegurar o cultivo axênico dos mesmos (4).

Visto que para cada espécie ou híbrido é necessário um protocolo específico para sua propagação *in vitro*, este trabalho objetivou determinar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e de gemas axilares de *Laelia lobata* 'Jenni' x *L. lobata* 'Alba', identificando o melhor tipo de explante para este híbrido.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Os explantes utilizados foram ápices caulinares e gemas axilares procedentes de brotações laterais, além de gemas axilares oriundas da base dos pseudobulbos com folhas completamente desenvolvidas (Figura 1). Estes foram extraídos de plantas adultas do híbrido *Laelia lobata* 'Jenni' x *Laelia lobata* 'Alba', com sete anos de idade, cultivadas em casa de vegetação. Os tamanhos de brotações e pseudobulbos variaram de 2,4 a 10,8 cm de comprimento. A área da base inicial dos explantes variou de 2 a 16 mm<sup>2</sup> (Quadro 1).

<b>QUADRO 1 - Tamanho das brotações e área inicial da base dos explantes</b>				
<b>Rep.</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Ápices caulinares</b>	<b>Gemas de brotações</b>	<b>Gemas de pseudobulbos</b>
	<b>cm</b>	<b>mm<sup>2</sup></b>		
1	2,4	2 x 2	-	-
2	4,4	3 x 2	2 x 2 e 3 x 2	-
3	3,5	2 x 2	-	-
4	5,0	2 x 2	-	-
5	4,3	2 x 2	-	-
6	4,5	1 x 2	3 x 3	3 x 2
7	4,7	3 x 2	3 x 4	2 x 2
8	5,2	2 x 2	3 x 2	3 x 2 e 3 x 3
9	5,8	3 x 2	3 x 5	3 x 2
10	6,5	3 x 2	3 x 4	2 x 4
11	5,2	3 x 3	2 x 4	-
12	7,9	3 x 2	3 x 2	3 x 2
13	6,9	3 x 2	3 x 1	-
14	6,5	2 x 2	-	3 x 1
15	7,0	3 x 1	3 x 2	-
16	8,7	2 x 2	3 x 4 e 3 x 2	-
17	7,5	3 x 2	4 x 4	2 x 1
18	8,2	3 x 2	2 x 2 e 2 x 4	-
19	11,0	3 x 2	-	3 x 1
20	9,2	3 x 1	-	-
21	10,8	3 x 3	3 x 1	-
22	12,5	2 x 2	-	-
23	4,2	2 x 2	2 x 4	-
24	8,0	1 x 2	2 x 2	-

Obs.: 1-2 e 23-24 são duas brotações retiradas, respectivamente, da base de um mesmo pseudobulbo.

As brotações e as bases dos pseudobulbos retiradas das plantas-matrizes inicialmente foram tratadas com solução de detergente neutro para laboratório 50% v/v (Vetec<sup>®</sup>), por 5 minutos, e em seguida enxaguadas com água desionizada estéril, até a retirada de todo detergente. Posteriormente, foram tratadas com álcool 70% v/v, por 5 minutos. Em seguida, em condições de câmara de fluxo laminar, as mesmas fontes de explantes foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2,0% v/v (produto comercial Globo<sup>®</sup>, 100% v/v), por 20 minutos, seguido de quatro enxaguaduras sucessivas com água desionizada estéril, nos respectivos tempos de 5; 10; 10 e 10 minutos. Durante todo o processo de desinfestação, os frascos que continham o material imerso nas soluções

desinfestantes e também na água foram agitados manualmente, em intervalos periódicos.

Anteriormente, ainda em câmara de fluxo laminar, utilizando-se estereomicroscópio (Nikon®), retiraram-se as folhas mais externas, procedendo-se, posteriormente, cortes longitudinais e transversais, de modo a obterem-se ápices caulinares portando alguns primórdios foliares. Este processo foi realizado em placa de Petri, tendo as brotações e bases dos pseudobulbos imersas em água de coco natural e filtrada, para evitar a oxidação e a desidratação dos explantes. Preparados os explantes, eles foram imersos sucessivamente, por alguns segundos, em álcool 70% v/v, em hipoclorito de sódio 2,0 % v/v (produto comercial Globo®, na concentração de 0,1% v/v)) e em água desionizada e estéril.

Visando evitar ou reduzir a oxidação fenólica, os explantes permaneceram por 16 a 20 horas na sala de transferência, imersos em água de coco natural previamente esterilizada por filtro-esterilização, em câmara de fluxo laminar e utilizando-se filtro com poro de 22 µm. Posteriormente, foram transferidos para o meio de cultivo.

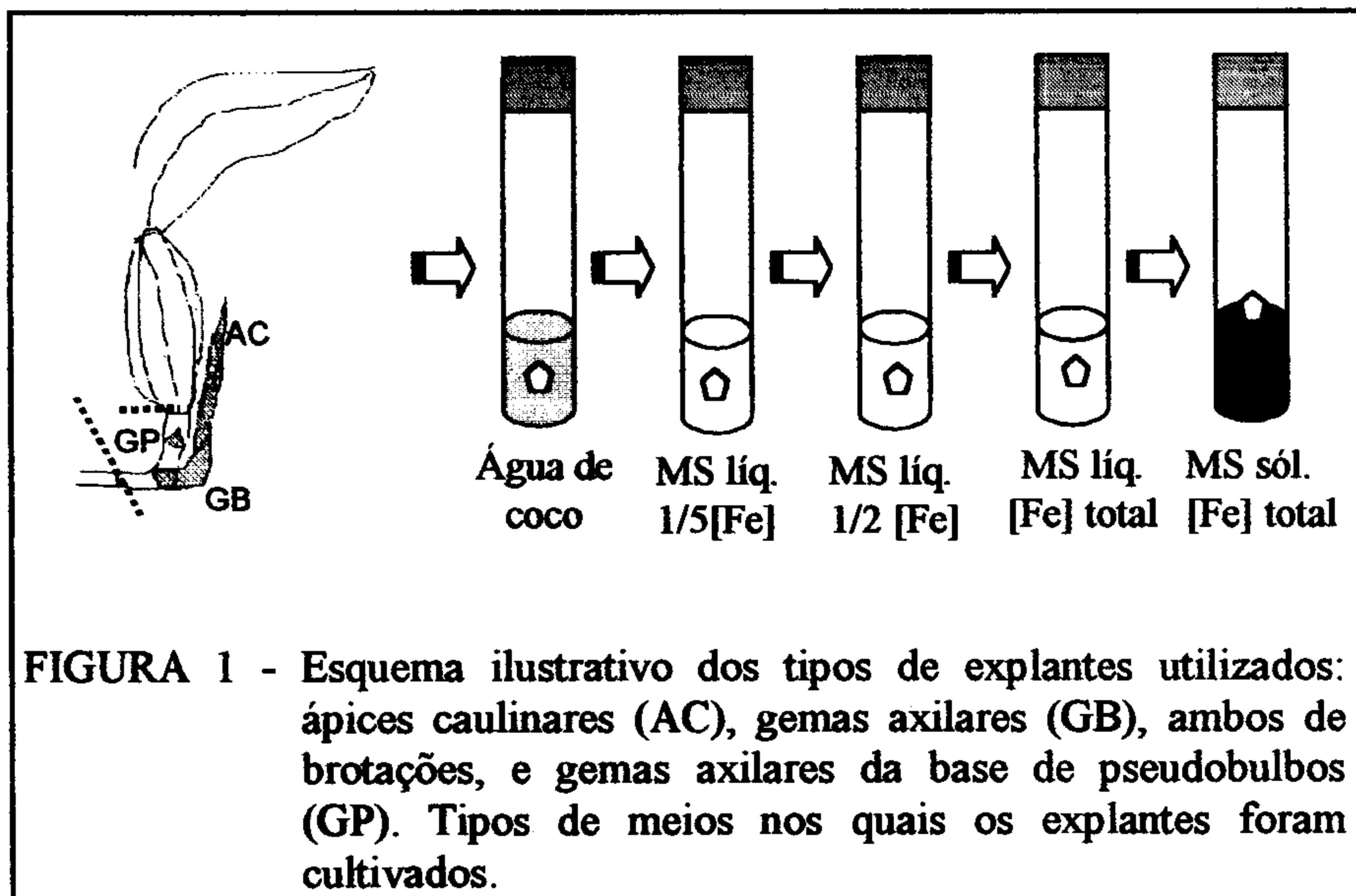
### *Fase morfogênica*

Com vistas ao processo morfogênico, os explantes foram cultivados em meio constituído pelos minerais nutrientes de MS (9), com aumento gradativo da concentração do componente ferro nos recultivos semanais (Figura 1). O meio de cultivo continha ainda 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 50 mL L<sup>-1</sup> de água de coco natural. Nos primeiros sete dias, o componente ferro foi adicionado com 1/5 de sua concentração normal; na segunda semana, aumentou-se sua concentração para 1/2; e a partir da terceira foi adicionado em sua concentração normal (27,8 mg L<sup>-1</sup> de sulfato ferroso).

O pH do meio de cultivo foi ajustado em 5,7 ± 0,1, sendo posteriormente distribuídos 5 mL de meio em tubos de ensaio, com dimensões de 25 x 150 mm. Os tubos de ensaio foram fechados com tampas de polipropileno transparente, suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®), e autoclavados a 121 °C e 1,05 kg cm<sup>-2</sup> de pressão, durante 20 minutos. Após a esterilização e em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente, um em cada tubo de ensaio. Após a inoculação dos explantes, a boca dos tubos foi novamente fechada, como descrito.

Os tubos de ensaio foram distribuídos aleatoriamente em uma mesa rotatória inclinada com agitação orbital de 3 rpm, incubados na sala de cultivo à temperatura de 27 ± 2 °C, permanecendo sete dias no escuro.

Após este período, os explantes foram recultivados para meio de mesma composição, porém com o componente ferro na metade da sua concentração normal na formulação de MS (9) e nas mesmas condições anteriores de cultivo, por mais uma semana.



Após 14 dias no escuro, os explantes foram novamente recultivados para meio de mesma composição, porém com o componente ferro em sua concentração normal, quando, então, foram transferidos para luz, com fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância de  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, luz do dia, 40 W), mantidas as demais condições. Aí, os explantes permaneceram por 38 dias nestas condições, até o intumescimento e início de desenvolvimento das gemas.

Para se analisar a capacidade morfogênica de ápices caulinares e gemas axilares desse híbrido, quando os explantes foram recultivados nos períodos de 7, 14 e 50 dias de cultivo, em câmara de fluxo laminar, avaliaram-se, a partir de cada explante, as seguintes características: a) porcentagem de contaminação visualmente detectável; b) grau de oxidação dos explantes (explantes totalmente oxidados, explantes oxidados com ápice verde, explantes verdes com extremidades oxidadas e explantes verdes expandidos) e coloração do meio de cultivo; e c) área final dos explantes, medida com papel milimetrado.

O experimento foi montado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos os três tipos de explantes com diferentes números de repetição. Cada repetição consistiu de um tubo de

ensaio contendo um explante, sendo: a) tratamento 1- ápices caulinares, com 24 repetições; b) tratamento 2- gemas axilares de brotações, com 19 repetições; e c) tratamento 3 - gemas axilares de pseudobulbos, com 10 repetições.

Os dados de área final dos explantes, aos 52 dias, foram interpretados utilizando-se análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para se avaliarem os demais dados, foi realizada uma análise estatística descritiva.

### *Fase organogênica*

Após 50 dias de cultivo, os explantes, já intumescidos e apresentando sinais aparentes de crescimento e desenvolvimento, foram transferidos para um novo meio, visando ao processo organogênico. O meio constituiu-se pelos minerais nutrientes de MS (9), com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 50 mL L<sup>-1</sup> de água de coco natural e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (Figura 1).

O pH do meio de cultivo foi ajustado em  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição de 8 g L<sup>-1</sup> de ágar (Isofarma<sup>®</sup>) previamente fundido em forno de microondas. Posteriormente, foram distribuídos 5 mL desse meio em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm. Continuando, os tubos de ensaio foram fechados com tampas transparentes de polipropileno e suas bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac<sup>®</sup>). Em seguida, a esterilização foi realizada em autoclave a 121°C e pressão de 1,05 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos. Após a esterilização e em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados no meio de cultivo, à temperatura ambiente, um em cada tubo de ensaio. Depois da inoculação dos explantes, a boca dos tubos foi fechada, como descrito.

Os tubos de ensaio dispostos em grades de metal foram colocados em estantes, na sala de cultivo, e mantidos a uma temperatura de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro e irradiância de 48 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por tubos fluorescentes (Osram<sup>®</sup>, luz do dia, 40 W), permanecendo nestas mesmas condições por 142 dias.

Para se analisar a capacidade organogênica de ápices caulinares e gemas axilares desse híbrido, quando transferidos para meio sólido sem regulador de crescimento e após um total de 78 dias de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de sobrevivência dos explantes e o desenvolvimento e a formação de novas estruturas e, ou, plântulas ao completar 142 dias de cultivo.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com diferentes números de repetição. As características foram avaliadas por meio de estatística descritiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Fase morfogênica*

#### *Porcentagem de contaminação*

Nos primeiros sete dias de cultivo, não se observou nenhuma contaminação aparente. Aos 14 dias, obteve-se baixa porcentagem de contaminação, apenas 1,9% do total de 53 explantes, sendo a contaminação por fungo em um tubo de ensaio cujo explante tinha sido extraído da base do pseudobulbo. Até os 50 dias de cultivo não se observou outra contaminação aparente.

Reinert e Mohr (12) e Arditti e Ernst (1) utilizaram para desinfestar explantes procedentes de plantas adultas de *Cattleya* solução de cloro comercial, cuja concentração e tempo de exposição variaram de 0,1 a 20%, por 5 a 30 minutos, álcool 70 e 95%, por cinco minutos, e solução de hipoclorito de cálcio (0,4 a 8%), por 20 a 30 minutos, dependendo do tipo de explante. Nesses trabalhos, não foi referida a porcentagem de contaminação dos explantes.

Em relação ao método de desinfestação utilizado no presente trabalho, pode-se considerá-lo eficiente para a obtenção de explantes axênicos, dada a baixa porcentagem de contaminação. Entretanto, em comparação aos dos trabalhos citados, o método de desinfestação utilizado neste trabalho foi rigoroso, visto que se utilizaram detergentes próprios para laboratório, álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 2,0% (produto comercial).

#### *Grau de oxidação dos explantes e coloração do meio de cultivo*

Os explantes avaliados visualmente mostraram-se responsivos ao meio e às condições de cultivo (Quadro 2). Nos primeiros sete dias, todos os explantes apresentavam-se oxidados. Quando transferidos para o meio contendo a metade da concentração de ferro, até aos 14 dias aumentou a porcentagem de explantes que se apresentavam oxidados com o ápice verde e verde com as extremidades oxidadas. Nenhum explante apresentou sinal de expansão.

Entre 14 e 50 dias de cultivo, quando os explantes permaneceram em meio líquido, com a concentração normal do componente ferro, houve aumento da porcentagem de explantes que se apresentavam verdes e com as extremidades oxidadas e verdes expandidos, denotando resposta ao processo morfogênico.

Essa alta porcentagem de explantes oxidados poderia ser atribuída à sensibilidade dos tecidos aos agentes desinfestantes, atenuada pelo método de desinfestação empregado neste trabalho. De acordo com Grattapaglia e



Machado (5), ápices muito pequenos, como para isolamento de meristemas, são freqüentemente tenros e susceptíveis aos agentes desinfestantes.

Elevada porcentagem de tubos de ensaio mostrava o meio de cultivo líquido com aspecto de solução límpida (Quadro 2), no decorrer do período de incubação até aos 50 dias, quando os explantes foram transferidos para o meio sólido, sem reguladores de crescimento.

**QUADRO 2 - Porcentagem de ápices caulinares (AP), gemas de brotações (GB) e gemas de pseudobulbos (GP) com o respectivo grau de oxidação dos explantes e coloração do meio de cultivo**

Período	Grau de oxidação e coloração	AP	GB	GP
		%		
7 dias	Totalmente oxidado	100	100	100
	Oxidado c/ápice verde	-	-	-
	Verde c/extrem. oxid.*	-	-	-
	Verdes expandidos	-	-	-
	Límpido	100	84,2	100
	Róseo	-	15,8	-
14 dias	Totalmente oxidado	20,8	36,8	66,7
	Oxidado c/ápice verde	75	52,6	22,2
	Verde c/extrem. oxid.*	4,8	10,6	11,1
	Verdes expandidos	-	-	-
	Límpido	100	94,7	100
	Róseo	-	5,3	-
50 dias	Totalmente oxidado	87,5	52,6	66,7
	Oxidado c/ápice verde	-	-	-
	Verde c/extrem. oxid.*	8,3	47,4	33,3
	Verdes expandidos	4,2	-	-
	Límpido	45,8	47,4	77,8
	Róseo	54,2	47,4	11,1
	Amarelo	-	5,2	11,1

\* Verde com extremidades oxidadas.

Foi importante a preparação dos explantes imersos em água de coco natural e filtrada e cultivados inicialmente em meio líquido, muito embora,

com apenas uma semana de cultivo, tenha-se observado a oxidação da maioria dos explantes. Como citado por Pierik (10), no caso de cultivo de ápices meristemáticos de *Cattleya* os tecidos lesionados adquirem coloração marrom muito rápido. Com base nisso, recomenda-se preparar os meristemas dentro de um meio líquido e cultivá-los depois, também em meio de cultivo líquido, visando facilitar melhor difusão das substâncias exsudadas pelos explantes, o que pode ser confirmado neste trabalho.

O meio de cultivo teve a concentração do componente ferro aumentada gradativamente, 5,56; 13,9; e 27,8 mg L<sup>-1</sup> de sulfato ferroso, variando da metade, um quinto, até a concentração total, visando evitar a oxidação dos explantes. Observou-se que os explantes mostraram-se mais responsivos ao processo morfogênico quando utilizadas as concentrações mais altas do componente ferro, embora tenha aumentado a porcentagem de meio de cultivo com a coloração rósea. Diferente do trabalho de Stoltz (13), que, estudando a influência do componente ferro na produção de massa fresca e multiplicação de protocormóides em calos de *Cattleya labiata*, concluiu que o maior crescimento foi obtido quando se utilizaram as concentrações de ferro quelatado entre 0,1 e 10 mmol L<sup>-1</sup>, não tendo observado mudança visual na coloração dos explantes em nenhum tratamento.

#### *Área média final dos explantes*

Os sinais de crescimento e desenvolvimento dos explantes puderam ser observados pelo aumento da sua área média, durante esta fase.

Antes de os explantes serem transferidos para o meio sólido, como já citado, mediu-se a área destes, sendo considerada área final dos explantes na fase morfogênica aquela tomada aos 50 dias de cultivo (Quadro 3), apesar de que estes continuaram a crescer e desenvolver na fase posterior, a organogênica.

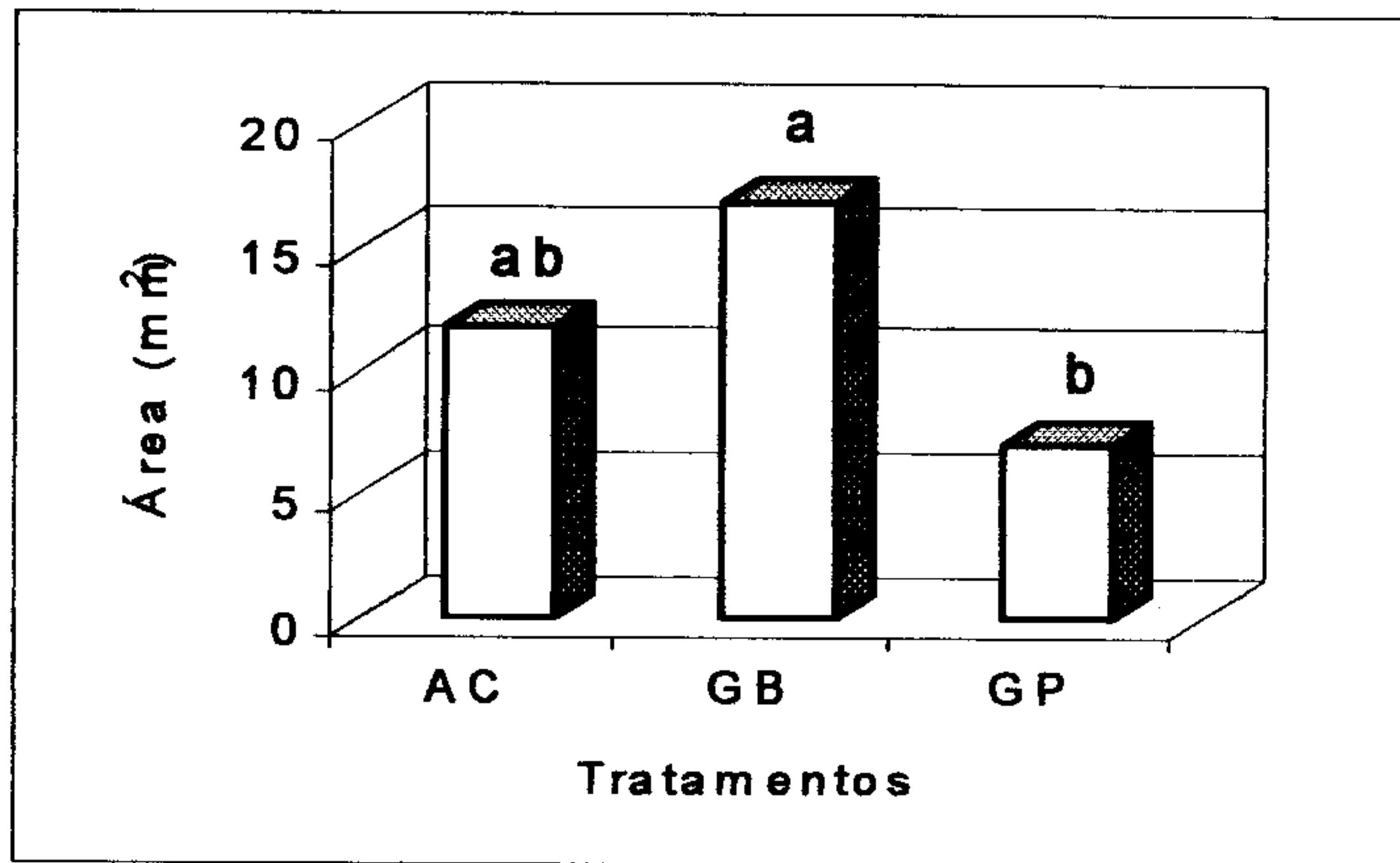
A importância de se medir as áreas inicial e final é que o tamanho dos explantes determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento. Explantes muito pequenos são mais sensíveis aos agentes descontaminantes. Por outro lado, quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de se lograr êxito na obtenção de plantas livres de patógenos, além de manipular menos tecidos que possam levar contaminantes superficiais para as condições assépticas (5). Outra vantagem de se trabalhar com

quantidades mínimas de tecido é a redução dos controles correlativos do restante da planta, que pode diminuir a capacidade de resposta do explante *in vitro* (5).

**QUADRO 3 - Área final dos explantes extraídos de ápices caulinares e gemas axilares das brotações e das gemas axilares da base dos pseudobulbos, na fase morfogênica, aos 50 dias de cultivo**

Rep.	Ápices caulinares	Gemas de brotações	Gemas de pseudobulbos
mm <sup>2</sup>			
1	3 x 3	-	-
2	3 x 2	2 x 3 e 3 x 4	-
3	2 x 2	-	-
4	2 x 2	-	-
5	2 x 2	-	-
6	3 x 3	4 x 3	4 x 3
7	4 x 5	3 x 4	1 x 1
8	4 x 3	4 x 2	2 x 3 e 2 x 4
9	1 x 2	4 x 4	3 x 4
10	2 x 2	3 x 4	3 x 5
11	2 x 3	3 x 4	-
12	2 x 3	4 x 6	3 x 4
13	3 x 5	5 x 8	-
14	5 x 5	-	-
15	5 x 5	2 x 4	-
16	4 x 4	4 x 6 e 5 x 6	-
17	3 x 5	5 x 5	1 x 2
18	4 x 5	4 x 5 e 4 x 7	-
19	2 x 4	-	-
20	2 x 4	-	-
21	4 x 7	3 x 4	-
22	3 x 3	-	-
23	4 x 4	4 x 5	-
24	3 x 3	3 x 3	-

Avaliou-se a área média alcançada pelos explantes (Figura 2). Os de gemas axilares de brotações (GB) alcançaram, em média, a maior área (16,8 mm<sup>2</sup>), diferindo significativamente da área das gemas axilares da base dos pseudobulbos (GP), que apresentaram, em média, 7 mm<sup>2</sup>.



**FIGURA 2** – Área média alcançada pelos três tipos de explantes avaliados: ápices caulinares (AC), gemas axilares de brotações (GB) e gemas axilares de pseudobulbos (GP), após 50 dias de cultivo *in vitro*. Colunas sob a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O maior aumento de área dos explantes de gemas axilares de brotação deveu-se, provavelmente, à menor porcentagem de oxidação e à melhor resposta morfogênica dos explantes, podendo resultar no desenvolvimento de algumas gemas axilares em plântulas completas.

Os trabalhos revisados não fazem referências a medidas de área final. De acordo com Carvalho (2), a partir de gemas axilares e apicais de plantas adultas do híbrido avançado de *Brassolaeliocattleya* Roberto Cardoso 'Floralia' x (*Laeliocattleya* Calminant 'La Tailerie' x *Laeliocattleya* Lina Cavaliere), submetidas ao mesmo método deste trabalho, observou-se pequeno processo organogênico em apenas 16% das gemas apicais extraídas das brotações e nenhuma formação de plântulas a partir de gemas apicais e axilares.

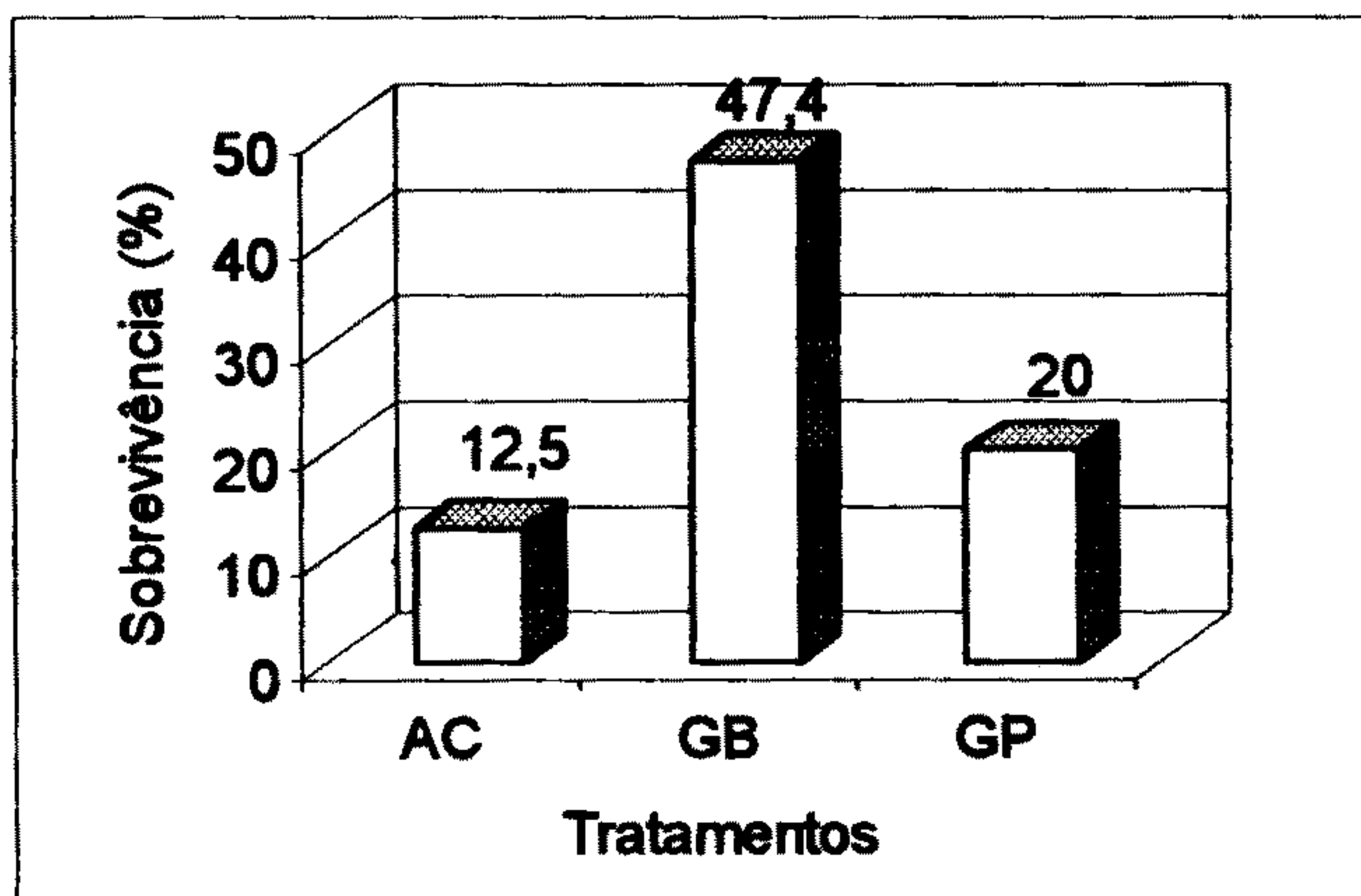
### *Fase organogênica*

Esta segunda fase do experimento, conduzida em meio de cultivo de mesma constituição quanto aos componentes químicos, porém solidificado, sem reguladores de crescimento, foi avaliada aos 78 e 142 dias de cultivo. Segundo Leffring (8), citado por Pierik (10), nas plantas do gênero *Cattleya*, a formação de protocormos geralmente tem lugar em

meios de cultivo líquidos, e o crescimento deles, até chegar a plântulas, alcança maior eficiência em meios sólidos.

*Porcentagem de sobrevivência e desenvolvimento dos explantes*

Aos 78 dias de cultivo, os explantes de gemas axilares de brotações (GB) foram os que apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência (47,4% do total), seguidos de gemas axilares de pseudobulbos (GP) e ápices caulinares (AC), com as taxas de 20 e 12,5%, respectivamente, do total de explantes que sobreviveram (Figura 3).



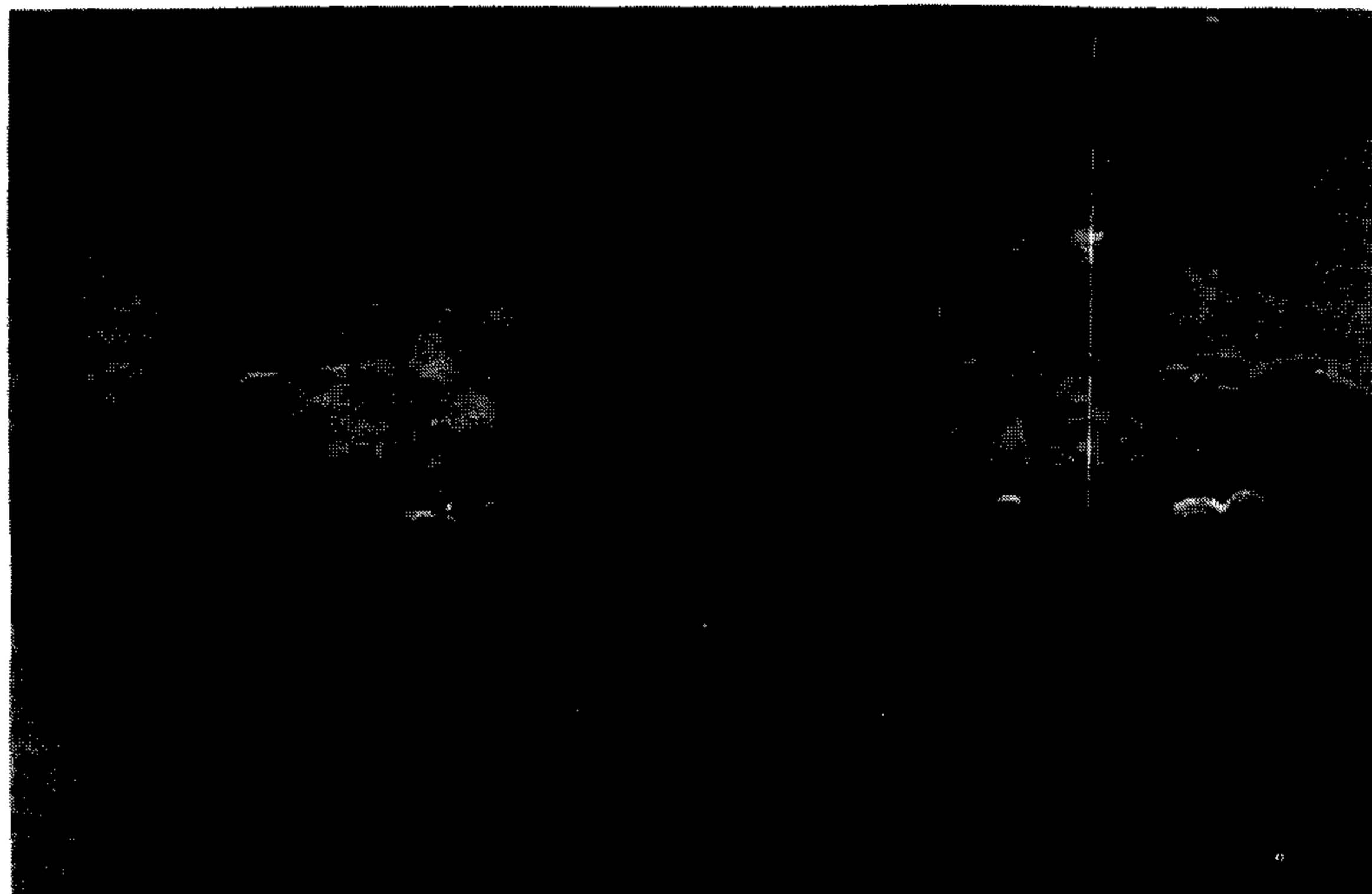
**FIGURA 3** – Porcentagem de sobrevivência dos três tipos de explantes avaliados: ápices caulinares (AC), gemas axilares de brotações (GB) e gemas axilares de pseudobulbos (GP).

Após 142 dias de cultivo, observou-se, como resposta organogênica, a formação de um calo compacto de coloração verde em oito explantes, sendo sete deles procedentes de gemas axilares (GB ou GP), dentre as quais uma formou várias partes aéreas e primórdios radiculares (Figura 4).

Estes resultados estão de acordo com Reinert e Mohr (12), que observaram que gemas axilares originadas da base de brotações novas, surgidas nos rizomas, quando cultivadas inicialmente por três semanas em meio de cultivo líquido, proporcionam maior taxa de sobrevivência (75%), maior crescimento dos explantes e maior desenvolvimento de calo, geralmente em um período de tempo mais curto. Segundo estes autores, no meio líquido a formação de plântulas é menos freqüente.

Para esses autores, ao transferir os explantes do meio líquido para o sólido, de mesma constituição química, houve certo bronzeamento dos explantes e o crescimento foi menor nas duas primeiras semanas. A partir

da terceira semana foi marcante o processo de morfogênese, formando de um a três protocormóides por explante, os quais chegaram a plântulas.



**FIGURA 4** – Desenvolvimento de partes aéreas e primórdios radiculares (à esquerda) e formação de estruturas (à direita), após 142 dias de cultivo em meio MS sólido, sem regulador de crescimento.

Da mesma forma, trabalhos revisados por Arditti e Ernst (1) lograram êxito na propagação *in vitro* de plantas do gênero *Cattleya*, utilizando gemas em início de crescimento, procedentes de brotações novas, obtendo a formação de protocormóides e posterior desenvolvimento destes em plântulas. Em um destes trabalhos revisados pelos mesmos autores (1) foi utilizado como explantes gemas terminais e ápices caulinares, também procedentes de brotações de 2 a 5 cm de comprimento, emergentes de plantas adultas. Durante o experimento, no mínimo 500 plântulas foram obtidas de cada explante após 10 meses de cultivo.

Arditti e Ernst (1) citam um experimento com *Brassocattleya* Princess Patrícia que logrou êxito na propagação vegetativa, por meio da cultura de ápice caulinar para produzir plântulas, utilizando-se a terceira gema extraída de brotações novas em crescimento, com 15 cm de comprimento. O autor desse experimento sugeriu que outras gemas poderiam ser empregadas como explantes, embora desaconselhando o uso de gemas já crescidas.

### *Grau de oxidação dos explantes*

A avaliação visual do estado oxidativo dos explantes mostra que, aos 78 dias de cultivo, 71,7% dos explantes tornaram-se completamente oxidados, 7,5% do total apresentavam-se oxidados com ápice verde e a mesma porcentagem (7,5%) de outros explantes permaneceram verdes, porém com as extremidades oxidadas. Os explantes que permaneceram completamente verdes e apresentando uma expansão em volume correspondeu a 13,2% do total.

É importante ressaltar que entre os três tratamentos o constituído por gemas axilares oriundas de brotações foi o que apresentou menor porcentagem de explantes oxidados. Entretanto, após 142 dias de cultivo, todos os explantes apresentavam-se completamente oxidados, apesar de alguns desenvolverem calos e plântulas, como mencionado no item anterior.

Como já citado, os trabalhos revisados não fazem referência ao estado fisiológico dos explantes. Na maioria deles, utilizaram-se gemas laterais, logrando êxito na propagação *in vitro* de *Cattleya*. Ainda são conflitantes os meios de cultivo utilizados, bem como os tipos e as concentrações de reguladores de crescimento. Geralmente utiliza-se meio líquido para os cultivos inicial e de manutenção, acrescido de ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e cinetina, e meio sólido sem fitorreguladores para crescimento e enraizamento. No presente experimento, utilizando ápices caulinares e gemas axilares, cultivadas em meio líquido constituído de minerais nutrientes de MS, com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, ocorreu o desenvolvimento morfogênico dos explantes. Quando estes foram transferidos para o meio sólido sem regulador de crescimento, obteve-se a formação de plântulas, alcançando os objetivos almejados.

Outro ponto que deve ser futuramente investigado e que ainda não está claro refere-se à estrutura formada. Alguns autores citam que se forma calo, outros dizem que são formados protocormóides, sendo então importante estudos anatômicos que identifiquem o tipo de estrutura formada.

## CONCLUSÃO

Embora os três tipos de explantes apresentem alta porcentagem de oxidação, todos mostram elevado potencial morfogênico, principalmente as gemas axilares de brotações, tomando-se uma via promissora para propagação em escala comercial desse híbrido.

## REFERÊNCIAS

1. ARDITTI, J. & ERNST, R. Micropropagation of orchids. New York, John Wiley & Sons, 1992. 682p.
2. CARVALHO, V.S. Morfogênese *in vitro* em orquídeas do grupo *Cattleya*. Viçosa, Minas Gerais, UFV, 2002. 164p. (Tese de mestrado).
3. EIGELDINGER, O. & MURPHY, L.S. *Cattleya*. In: Eigeldinger, O. & Murphy, L.S. (eds.). *Orchids – A complete guide to cultivation*. London, John Gifford, 1972. p. 154-67.
4. GEORGE, E. F. Equipment and procedures. In: George, E. F.(ed.). *Plant propagation by tissue culture. The Tecnology*. Basingstoke, Ed. Exegetics Limited, 1993. V.1. p. 95-126.
5. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. V.1. p. 183-260.
6. LAKSHMANAN, P.; LOH, C.S. & GOH, C.J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using thin section culture. *Plant Cell Reports*, 14: 510-4, 1995.
7. MENEZES, L. C. *Laelia purpurata*. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1995. 143p.
8. LEIFERT, C.; MORRIS, C.E. & WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants. Reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13: 139-83, 1994.
9. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-97, 1962.
10. PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.
11. PRAKASH, L.; LEE, C.L. & GOH, C.J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel aproach – Thin section culture. *Journal of Orchid Society India*, 10 (1-2): 31-41, 1996.
12. REINERT, R.A. & MOHR, H.C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 91: 664-71, 1967.
13. STOLTZ, L. P. Iron nutrition of *Cattleya* orchid grown *in vitro*. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 104: 308-10, 1979.