

Micropropagação de *Cattleya forbesii* Lindley (Orchidaceae) Usando Combinações de Auxina e Citocinina

Betty Cristiane Kuhn¹, Letícia Oliveira Claudino², Sama Beatriz Kuhn³, Maria Auxiliadora Milanese Gutierrez⁴, Claudete Aparecida Mangolin⁵, Maria de Fátima Pires da Silva Machado⁶.

1. Dra. em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Departamento de Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá. 2. Mestre em Genética e Melhoramento. 3. Doutoranda do Programa de Biologia Comparada. Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá. 4. Docente do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá. 5. Docente do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Maringá. 6. Docente do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Maringá.

bettybio@hotmail.com

Palavras-chave

Brotos
Cultivo *in vitro*
Reguladores de crescimento

Resumo:

As orquídeas do gênero *Cattleya*, de ocorrência natural no Brasil, são comercializadas como plantas ornamentais e contam com um mercado em contínua expansão. Visando atender a crescente demanda, são necessários estudos para aprimorar as técnicas de propagação *in vitro*, possibilitando a produção em larga escala. O objetivo deste estudo foi de estabelecer os tipos e as concentrações de auxina e citocininas adequadas para o crescimento e indução de brotos em plântulas de *Cattleya forbesii* cultivadas *in vitro*. Para tanto, plântulas com aproximadamente 1,0 cm foram inoculadas em meio de cultura Knudson C, com combinações dialélicas dos reguladores de crescimento IBA e KIN nas seguintes concentrações: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg · L⁻¹, com adição de 6g/L de ágar e p.H 5,4. Após seis meses de cultivo foi observado que a adição de diferentes concentrações de IBA e KIN ao meio de cultura KC estimulou de forma diferencial e significativa a produção de brotos, de raízes e de folhas nas plântulas de *Cattleya forbesii*. O comprimento da raiz e da parte aérea também foi estimulado por concentrações diferentes de IBA e KIN. O número maior de brotos (10,85) foi verificado nas plântulas mantidas no meio KC suplementado com a combinação 1,5 mg · L⁻¹ IBA x 1,0 mg · L⁻¹ KIN. A indução de gemas apicais ocorreu no meio de cultura suplementado com proporções maiores de IBA, e a indução de raízes no meio suplementado com proporções maiores de KIN, indicando que os ápices caulinares desta espécie apresentam respostas e competência diferenciadas para a organogênese em meio de cultura contendo reguladores de crescimento.

Artigo recebido em: 10.11.2014.

Aprovado para publicação em: 29.03.2015.

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, porém, muitas destas estão correndo risco de extinção, devido à destruição de seu habitat e às coletas predatórias, principalmente com o objetivo da comercialização destas plantas (COLOMBO et al., 2004). Para suprir a demanda comercial sem atingir populações naturais, a germinação das sementes e a micropropagação *in vitro* tem sido apontada como ferramentas para a produção em larga escala em curto espaço de tempo, produzindo plantas de alta qualidade fitossanitária, independentemente da época do ano (SOARES et al., 2009).

As sementes de orquídeas se diferenciam da maioria das outras espécies por não possuírem reservas nutritivas para promover a germinação (RAMOS, 1969). A germinação de tais sementes, só ocorre depois de instalada à simbiose com os fungos micorrizicos. Devido a esse fator Knudson (1946) desenvolveu meio de cultura apropriado para a germinação de sementes de orquídeas na ausência de simbiose com fungos micorrizicos. Embora diferentes meios de cultivo possam ser utilizados, o “KC”, formulado por Knudson (1946), vem sendo o mais recomendado até o presente para a germinação da maioria das espécies de orquídeas.

O uso de reguladores de crescimento como auxinas e citocininas também podem ser interessantes para o crescimento e multiplicação de mudas de orquídeas cultivadas *in vitro*, as auxinas desempenham funções importantes em quase todo o ciclo de vida da planta, como a divisão e expansão celular, desenvolvimento de tecidos vasculares, e no processo de indução de raízes laterais, quando utilizadas em concentrações adequadas, nos tecidos ou células de cada espécie aptas a receberem estes estímulos (FRIML, 2003). As auxinas são utilizadas em diferentes concentrações, e as respostas estão relacionadas com o órgão vegetal e a espécie; o excesso de auxinas pode provocar efeitos inibitórios ou deletérios para a planta (ORI, 2006). Segundo Bhojwani & Razdan (1996), as auxinas sintéticas como o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indol 3-butírico (IBA) têm sido preferidas para utilização em meio de cultura por serem mais estáveis do que ácido 3-indol acético (AIA) por exemplo; o autor ainda cita que para a multiplicação de brotos a sua concentração varia de 0,1 a 1 mg · L⁻¹. Na cultura de tecidos as citocininas são incorporados principalmente para a divisão e diferenciação celular de brotações, a partir de calos e órgãos. Estes compostos também são utilizados para a proliferação e liberação de gemas axilares de dominância apical, aumentando a divisão celular (BHOJWANI & RAZDAN, 1996).

De acordo com as considerações registradas por Soares et al. (2009), a composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores que determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Araújo, Carneiro e Prabhu (1999) apontam que diferentes espécies de orquídeas podem se desenvolver de maneira distinta quando cultivadas no mesmo meio de cultura, indicando que cada espécie tem uma concentração adequada de reguladores de crescimento para a produção de protocórmios e crescimento *in vitro*.

Deste modo, no presente estudo o objetivo foi avaliar combinações de concentrações diferentes da auxina IBA e da citocinina *N*-(2-furanilmetil)-7H-purina-6-amina (KIN) para proporcionar um desenvolvimento mais rápido e eficiente de plântulas de *Cattleya forbesii*. As espécies de *Cattleya* estão dentre as orquídeas mais apreciadas por colecionadores e também mais comercializadas devido a beleza de suas flores. Entretanto os investimentos na micropropagação de espécies deste gênero são escassos (SILVA; CALLEGARI; BODANESE, 2000; KRAPIEC; MILANEZE; MACHADO, 2003; DIGNART et al., 2009; SOARES et al., 2009; PRIZÃO et al., 2012) frente ao valor comercial e ao potencial promissor da técnica do cultivo *in vitro* para diversas espécies de plantas. A expectativa foi de encontrar uma ou mais combinações de IBA e KIN adequadas para promover maior crescimento de partes aéreas e raízes, e para induzir a formação de brotos, os quais podem ser usados para multiplicar o número de mudas propagadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos com as plântulas de *C. forbesii* foram realizados no Laboratório de Cultura de Orquídeas do Museu Dinâmico Interdisciplinar (Bloco O33) da Universidade Estadual de Maringá – PR, no ano de 2010. As cápsulas maduras de *C. forbesii*, proveniente de autofecundação, foram coletadas próximas

a um rio na cidade de Maringá. As cápsulas foram abertas para retirada das sementes, as quais foram armazenadas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante, aproximadamente, seis meses. Para determinar a viabilidade das sementes foi realizado o teste de tetrazólio, que se fundamenta na alteração da coloração dos tecidos da semente em presença de uma solução de sal de tetrazólio; este sal é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto denominado de formazan, de coloração vermelha-carmim, enquanto que os tecidos mortos ou muito deteriorados não apresentam coloração (FOGAÇA et al., 2006).

Para a germinação, as sementes foram embebidas em água destilada durante 24 horas, submersas em hipoclorito de sódio comercial 15% por 15 minutos para fazer a assepsia das mesmas, e lavadas 4 vezes com água destilada e esterilizada. Em seguida as sementes foram colocadas para germinar no meio de cultura.

O meio de cultura básico utilizado foi a formulação “C” de Knudson (1946), modificado pela adição de 20 g/L de sacarose, 6 g de ágar (HIMEDIA, “Agar Agar, Type 1”), e 100 g/L de banana nanica (estágio de maturação 7; OLIVEIRA-NETO, 2002). Os frascos com meio de cultura foram autoclavados durante 20 minutos em 1 atm de pressão e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a inoculação das sementes os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, e com iluminação contínua proporcionada por lâmpadas fluorescentes de 40 Watts.

Após 10 meses, as plântulas crescidas das sementes germinadas (com a aproximadamente 1,0 cm e 2 folhas) foram transferidas para o meio de cultura “C” de Knudson suplementado com reguladores de crescimento; foram usadas combinações dialéticas da auxina IBA e da citocinina KIN, nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 1,5 e 2,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, de modo a obter 25 tratamentos. O pH do meio ajustado com KOH (1 N) ou HCl (50%) para $5,2 \pm 0,1$ antes da autoclavagem (20 minutos, com 1 atm e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em cada frasco foram inoculadas 5 plântulas. Os experimentos foram feitos com 4 repetições para cada combinação de auxina/citocinina testada.

Após a inoculação as réplicas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e com iluminação contínua proporcionada por lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, com intensidade luminosa de $14,9\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

Após seis meses mantidas *in vitro*, as plântulas foram analisadas quanto ao número de folhas e raízes formadas, comprimento das folhas e raízes, e o número de brotos induzidos por plântula. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado nas 4 repetições, e os dados foram analisados utilizando o programa SAS (The SAS System Copyright ã 1999-2000 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; System for Windows V8). O teste de Tukey foi realizado em nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de diferentes concentrações de IBA e KIN no meio cultura KC estimulou de forma diferencial e significativa a produção de brotos, de raízes e de folhas em plântulas de *C. forbesii* (Tabela 1).

A multiplicação de brotos foi mais pronunciada nas plântulas inoculados em meio de cultura contendo $1,5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de IBA, combinada com 0,5 ou $1,0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIN; nas referidas combinações foram observados 9,9 e 10,65 brotos respectivamente, mostrando que a utilização de combinações específicas dos reguladores de crescimento IBA e KIN e proporções maiores de IBA:KIN (3:1 e 2:1) foram importantes para induzir a produção de mudas *in vitro* de *C. forbesii* (Tabela 2).

Tabela 1 – Análise de variância para as características NB (número de brotos), NR (número de raízes), NF (número de folhas), CR (comprimento das raízes) e PA (comprimento da parte aérea) das plântulas de *Cattleya forbesii*, cultivada em meio KC, suplementados com combinações dialélicas (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg · L⁻¹) de IBA e KIN.

Fonte de variação	NB	NR	NF	CR	PA
Concentração	100,21**	44,47**	20,67**	5,52**	1,15**
Resíduo	26,49	9,19	4,33	1,44	0,19
CV(%)	87,98	68,17	34,2	60,96	37,57

** Significante em nível de 1% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 2 – Teste de média para as variáveis NB (nº de brotos), NR (nº de raízes), NF (nº de folhas), CR (comprimento das raízes), e CF (comprimento de folhas), das plântulas de *Cattleya forbesii*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de IBA x KIN, após 6 meses da inoculação.

IBA x KIN	NB	NR	NF	CR	CF
0,0 x 0,0	8,5 abc	4,6 abcd	5,1 cde	1,97 abc	1 cdef
0,0 x 0,5	8,05 abc	5,3 abcd	5,2 cde	2,52 ab	0,9 def
0,0 x 1,0	6,7 abc	6,4 ab	5,55 bcde	2,48 ab	0,89 def
0,0 x 1,5	7,05 abc	5,9 abcd	4,8 de	2,15 ab	1,06 bcdef
0,0 x 2,0	5,2 abc	4,65 abcd	5,75 bcde	2,43 ab	0,85 ef
0,5 x 0,0	8,45 abc	5,2 abcd	5,6 bcde	2,36 ab	0,86 ef
0,5 x 0,5	8,1 abc	5,7 abcd	7,15 abcd	2,34 ab	1,32 abcde
0,5 x 1,0	5,85 abc	6,7 a	5,4 cde	2,17 ab	1,34 abcde
0,5 x 1,5	3,0 c	3,25 abcde	8,45 a	1,87 abc	1,36 abc
0,5 x 2,0	2,55 c	4,5 abcde	4,6 e	2,23 ab	1,19 abcdef
1,0 x 0,0	7,1 abc	6 abcd	5,1 cde	3 a	0,98 cdef
1,0 x 0,5	6,3 abc	6,05 abc	5,75 bcde	2,51 ab	1,25 abcdef
1,0 x 1,0	3,05 c	3,55 abcde	6,4 abcde	1,72 abc	1,55 ab
1,0 x 1,5	4,6 bc	4,85 abcd	5,35 cde	1,59 bc	1,4 abc
1,0 x 2,0	4,45 bc	4,9 abcd	7,5 abc	1,51 bc	1,22 abcdef
1,5 x 0,0	6,65 abc	5,05 abcd	5,75 bcde	2,42 ab	1,1 abcdef
1,5 x 0,5	9,9 ab	4,4 abcd	7,4 abc	1,8 abc	1,61 a
1,5 x 1,0	10,65 a	3,2 abcde	7,85 ab	1,25 bc	1,52 ab
1,5 x 1,5	3,8 c	2,5 de	5,8 bcde	1,71 abc	1,16 abcdef
1,5 x 2,0	4,85 abc	4,7 abcde	7,1 abcd	1,91 abc	1,26 abcdef
2,0 x 0,0	5,15 abc	5,2 abcde	5,85 bcde	2,18 ab	0,92 def
2,0 x 0,5	3,25 c	0,35 e	5,9 bcde	0,59 c	1,48 abc

IBA x KIN	NB	NR	NF	CR	CF
2,0 x 1,0	5,4 abc	2,95 bcde	7,15 abcd	1,34 bc	1,26 abcdef
2,0 x 1,5	4,5 bc	2,55 cde	6,2 abcde	1,9 abc	1,19 abcdef
2,0 x 2,0	3,15 c	2,75 cde	5,5 bcde	1,29 bc	0,76 f

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey. Médias acompanhadas pela letra “a” apresentaram desempenho superior.

Concentrações de IBA (0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹) na presença ou ausência de citocininas (6BA ou KIN) também foram descritas como mais efetivas para induzir a brotação em plântulas de *C. walkeriana* (Krapiec et al. 2003). Deste modo, as indicações são de a formação de gemas caulinares em *C. forbesii* e em *C. walkeriana* foi estimulada por proporção maior de auxina, contrariando a proposição e expectativa de que proporções maiores de citocininas atuam na divisão e diferenciação celular, sobretudo na formação de gemas caulinares em cultura de ápices caulinares (KERBAUY, 2004).

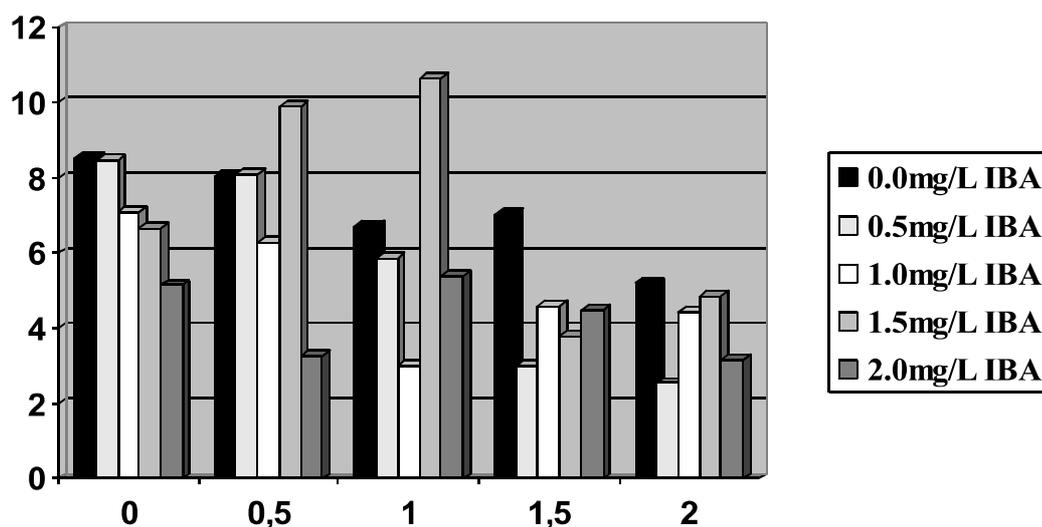
Nos ápices caulinares de *C. forbesii*, o IBA na ausência de KIN não estimulou a formação de número maior de brotos, indicando a necessidade de suplementação do meio KC com combinações de IBA e KIN para estimular a brotação, mas em *C. walkeriana*, Krapiec et al., (2003), descreveram o número maior de brotos em concentrações altas de IBA (1,5 mg · L⁻¹) na ausência de cinetina. Tais evidências, que contrariam a proposição de que proporções maiores citocininas em relação às proporções de auxinas estimulam a formação de gemas em ápices caulinares cultivados *in vitro*, pode ser uma particularidade em espécies de *Cattleya*, ou pode ser mais uma das características marcantes da fisiologia particular de plantas epífitas, que merece ser investigada futuramente. Exemplos de espécies epífitas que parecem possuir capacidade biossintética de auxina e citocinina igualmente elevadas num único órgão (raiz) foram descritas por Peres et al., (1997).

Na Figura 1 é possível evidenciar que a adição de IBA na ausência de KIN, ou a adição de KIN na ausência de IBA, foram igualmente eficientes para promover o desenvolvimento das plântulas de *C. forbesii*, porém não promoveu um maior desenvolvimento do que aquele observado nas plântulas cultivadas em meio KC na ausência de IBA e KIN. As combinações contendo concentrações maiores do que 1,5 mg · L⁻¹ de IBA ou KIN (2,0 mg · L⁻¹) não foram mais eficientes para induzir a formação de brotos nos ápices caulinares, indicando que concentrações maiores do que 1,5 mg · L⁻¹ de IBA ou KIN são dispensáveis para a micropropagação de *C. forbesii*. Combinações contendo 2,0 mg · L⁻¹ de IBA ou KIN foram igualmente, ou menos, eficientes para promover a indução e crescimento de raízes e partes aéreas (Tabela 2; Figura 1), e não foi observado a formação de calos usando a concentração mais alta de auxina (2,0 mg · L⁻¹).

Enquanto as combinações de 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 0,5 mg · L⁻¹ de KIN ou 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x 1,0 mg · L⁻¹ de KIN induziram a formação de apenas 1,44 e 1,72 brotos em plântulas de *C. walkeriana* (KRAPIEC, MILANEZE & MACHADO, 2003), o número de brotos encontrado em *C. forbesii* nas referidas combinações foi cerca de sete vezes maior. Tais evidências reiteram os postulados de que cada espécie de orquídea tem uma concentração mais adequada de reguladores de crescimento para estimular o seu desenvolvimento *in vitro*. Espécies do mesmo gênero, a exemplo de *C. forbesii* e *C. walkeriana*, apresentam requerimentos diferentes para a micropropagação, salientando a necessidade e importância de se investir em

testes com diferentes combinações de reguladores de crescimento para **cada espécie de orquídea a ser propagada *in vitro***.

Figura 1: Número de brotos induzidos nas plântulas de *Cattleya forbesii*, cultivadas em meio KC suplementados com combinações dialélicas de 0,0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg · L⁻¹ de IBA x KIN, após 6 meses da inoculação.



Outras espécies de *Cattleya* têm sido propagadas *in vitro* usando preferencialmente tipos e concentrações diferentes de meios de cultura, ou concentrações diferentes de sais, ou de suplementos complexos, que não os reguladores de crescimento. Concentração dobrada dos reagentes do meio KC foi testada para promover um crescimento maior em plântulas de *C. loddigesii*, mas a multiplicação foi mais eficiente usando o meio KC na sua concentração original (SOARES et al., 2009).

A adição de concentrações de silicato de potássio no meio KC aumentou a produção de brotos em plântulas de *C. loddigesii* (SOARES et al., 2011), enquanto a adição de concentrações baixas ou altas de ácido giberélico (GA₃) não mostrou qualquer efeito para a indução de brotação nesta espécie de *Cattleya* (SOARES et al., 2009). O GA₃ tem apresentado um efeito positivo apenas para aumentar o florescimento em híbridos de *Cattleya* (CARDOSO, ONO, RODRIGUES, 2010). Concentrações diferentes de sacarose e condições de luminosidade também foram investigadas na micropropagação de *C. walkeriana* (DIGNART et al., 2009). Para a espécie *C. bicolor*, a adição de grafite no meio KC foi eficiente para induzir a formação de brotos (PRIZÃO et al., 2012).

A suplementação do meio KC com as diferentes concentrações de IBA e KIN, também estimulou de forma diferencial e significativa a formação de raízes e de folhas nas plântulas de *C. forbesii*, mas o aumento no número de raízes e folhas foi verificado em combinações de IBA e KIN diferentes daquela que induziu o número maior de brotos (Tabelas 1 e 2). Enquanto o número maior de brotos foi verificado nas proporções 2:1 e 3:1 de IBA:KIN, o número maior de raízes foi encontrado nas plântulas mantidas com 1:2 de IBA:KIN

e o número maior de folhas nas plântulas mantidas com 1:3 de IBA:KIN (Tabela 2). A formação de raízes em *C. forbesii* foi estimulada por maior proporção da citocinina KIN, contrariando a expectativa de que maiores proporções de auxinas estimulam a indução de raízes em ápices caulinares cultivados *in vitro* (KERBAUY, 2004), e indicando que os ápices caulinares de *C. forbesii* devem ter características metabólicas particulares para a síntese de seus hormônios endógenos. Estas são evidências do efeito diferencial de proporções de auxinas:citocininas para o desenvolvimento de plântulas de *C. forbesii in vitro*, determinando uma morfogênese diferencial e anulando uma expectativa de encontrar uma determinada combinação de auxina:citocinina que seja a mais adequada para o desenvolvimento global das plântulas, ou seja, uma mesma combinação capaz de induzir o maior número de brotos, de raízes, e de folhas.

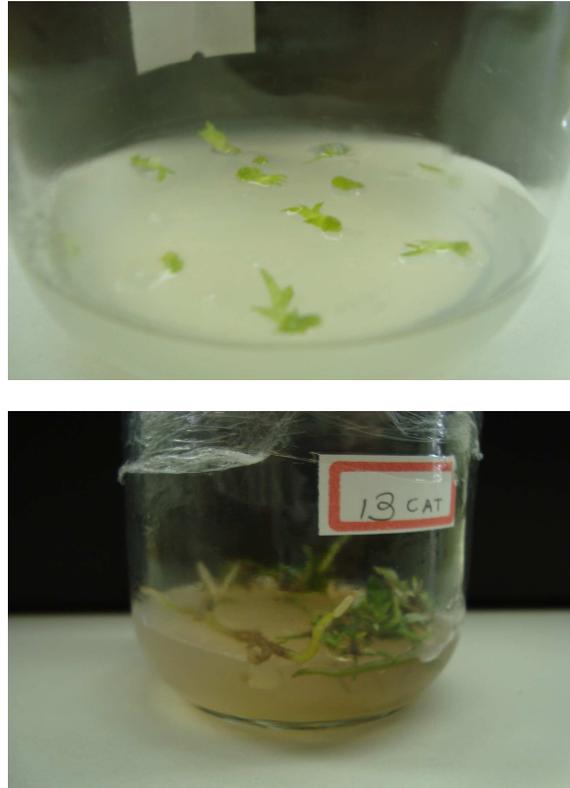
A suplementação de meios de cultura com reguladores de crescimento pode ser considerado como um procedimento adequado e efetivo, porém, apresenta o inconveniente de induzir respostas morfogenéticas diferenciais, que implicam em procedimentos práticos adicionais. Para a micropropagação da espécie *C. forbesii*, por exemplo, inocular as plântulas em meio KC suplementado com IBA:KIN nas proporções 2:1 ou 3:1 é uma prática que conduz a indução de brotos, os quais após serem induzidos podem ser transferidos para o meio KC suplementado com IBA:KIN na proporção 1:2 para induzir a formação de raízes, e numa terceira etapa, os brotos enraizados podem ser transferidos para o meio KC suplementado com IBA:KIN na proporção 3:1 para induzir o maior desenvolvimento das partes aéreas. As medidas do comprimento das raízes e das folhas também evidenciaram que proporções distintas de IBA:KIN são mais adequadas para o maior crescimento destes tecidos (Tabela 2).

Somente as proporções de IBA:KIN que propiciaram o desenvolvimento do maior número de raízes permitiram também uma taxa de crescimento satisfatória; o maior número de raízes foi encontrado no meio suplementado com $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA x $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN: 6,7 raízes em média por planta com um comprimento de 2,18 cm por raiz (Figura 02), evidenciando que esta concentração proporciona não só a formação mais também o desenvolvimento das raízes de *C. forbesii* (Tabela 2). Nas plântulas de *C. forbesii* a formação de raízes foi estimulada na ausência de IBA ou com $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de IBA combinado com $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIN, mas o crescimento destas foi maior na ausência de IBA e com 0,5 e $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de KIN (2,50 cm), enquanto as raízes no controle tiveram um crescimento em média de 1,97 cm (Tabela 2). É possível verificar que a adição de IBA em meio de cultura estimulou a indução de raízes, e a indução e o crescimento de folhas, mas parece ser dispensável para crescimento das raízes. RODRIGUES (2009) observou que a adição de IBA em meio de cultura KC também estimulou a formação de raízes, mas foi dispensável para crescimento destas e para o desenvolvimento de folhas em plântulas de *C. bicolor* e *C. intermedia alba*.

A micropropagação de orquídeas *Cattleya* usando reguladores de crescimento pode ser considerada estratégia interessante, mas que requer o desenvolvimento de protocolos específicos para os diferentes genótipos e de etapas adicionais de transferências para diferentes proporções de auxina:citocininas, para promover o desenvolvimento completo e eficiente das plântulas de determinada espécie, a exemplo de *C. forbesii*.

Um efeito diferencial de genótipos em resposta as proporções de auxina:citocininas pode ser evidenciado mesmo dentro da espécie *C. forbesii*. Os valores altos dos coeficientes de variação (CV%) indicados na Tabela 1 para os parâmetros analisados (NB, NR, NF, CR, e CF) devem ser reflexos da variabilidade genética presente nesta espécie.

Figura 2: plântulas de *Cattleya forbesii* com média de 1cm (A); e após o crescimento em meio contendo $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA x $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN.



A análise de segmentos aleatórios de DNA amplificados por td-PCR (*Touchdown-Polymerase Chain Reaction*) mostrou um polimorfismo alto (89,19%) em plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* de *C. forbesii* (KUHN, 2012). O valor maior estimado de identidade genética entre as plântulas de *C. forbesii* foi $I = 0,86$ (NEI, 1972), e 95% das plântulas apresentaram valores de $I < 0,85$. De acordo com as proposições de Thorpe & Solé-Cava (1984) valores de $I < 0,85$ são frequentemente encontrados entre espécies geograficamente isoladas, em processo de especiação, ou entre espécies cogenéricas. Desta forma, é possível prever que se genótipos da mesma espécie respondem de forma diferencial a determinadas proporções de auxina:citocininas, é de se esperar que os genótipos de espécies diferentes de *Cattleya* requeiram tipos ou proporções de reguladores de crescimento diferentes para os seus desenvolvimentos *in vitro*.

A análise dos efeitos da adição de combinações de IBA e KIN no desenvolvimento de plântulas de *C. forbesii* mostrou a importância de testar combinações dialélicas de auxinas:citocininas para traçar as estratégias adequadas para induzir brotações e estimular o crescimento de estruturas como raízes e partes aéreas das plântulas a serem micropropagadas. A multiplicação das mudas de sementes germinadas *in vitro* usando ápices caulinares é um aspecto importante para complementar os investimentos da germinação assimbiótica das orquídeas.

A adição de reguladores de crescimento pode ser uma alternativa fisiologicamente coerente e segura, mas a sensibilidade diferencial de grupos de células específicas às proporções diferentes de auxinas:citocininas, conduz a respostas diferenciadas e específicas. Foi também salientado a importância de se fazer experimentos para cada espécie de orquídea porque as indicações são de que espécies do mesmo gênero

respondem de maneira diversa aos mesmos tipos e às mesmas proporções de auxinas:citocininas. Por isso, para assegurar a micropropagação de espécies de orquídeas é importante que cada protocolo testado seja divulgado, no sentido de catalogar a forma de micropropagação destas espécies tão importantes do ponto de vista comercial e do ponto de vista ambiental. A produção de mudas usando ápices caulinares, sem a formação de calos, é uma estratégia mais segura para multiplicar mudas de *C. forbesii* geneticamente uniformes, de interesse comercial, e para assegurar a diversidade genética original das sementes.

CONCLUSÃO

A micropropagação de ápices caulinares de *Cattleya forbesii* em meio de cultura KC suplementado com os reguladores de crescimento IBA e KIN é procedimento que deve ser feito em mais de uma etapa, porque requer combinações diferentes para a indução de gemas apicais, e para a formação e o desenvolvimento de raízes e folhas. A indução de gemas apicais ocorre no meio de cultura suplementado com proporções maiores da auxina IBA, e a indução de raízes no meio suplementado com proporções maiores da citocinina KIN, indicando que os ápices caulinares desta espécie apresentam respostas e competência diferenciadas para a organogênese em meio de cultura contendo reguladores de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.G.; CARNEIRO, I.F.; PRABHU, A.S. Produção *in vitro* de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiás, v. 20, n. 2, p. 67-71, jul/dez, 1999.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. Edição revisada. Amsterdam: Elsevier, 1996.
- CARDOSO, J.C.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Gibberellic acid and water regime in the flowering induction of *Brassocattleya* and *Cattleya* hybrid orchids. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 28, n. 4, p. 395-398, out/dez, 2010.
- COLOMBO, L.A. FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M. FONSECA, I.C.B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 26, n. 2, p. 253-258, jul, 2004.
- DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGAS, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, mai/jun, 2009.
- FOGAÇA, C.A.; MALAVASI, M.M.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, U.C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. **Caesalpinaceae**. **Revista Brasileira de Sementes**. Pelotas, v. 28, n. 3, p. 101-107, dez, 2006.
- FRIML, J. Auxin transport. **Current Opinion in Plant Biology**. **Tuebingen**, v. 6, n. 1, p. 7-12, 2003.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, Estados Unidos da América, v. 15, n. 14, p. 214 -217, 1946.
- KRAPIEC, P.V.; MILANEZE, M.A.; MACHADO, M.F.P.S. Effects of different combinations of growth regulators for bud induction from seedlings of *Cattleya walkeriana* Gardner (*Orchidaceae*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 179-182, 2003.
- KUHN, B.C. **Análise da diversidade genética em *Cattleya forbesii* (Lindley) (Orchidaceae) propagadas *in vitro***. 2011. 32 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Maringá, 2011.
- NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**. Califórnia, v. 3, n. 4, p. 460-465, 1972.

- OLIVEIRA-NETO, O.C. **Maturação e conservação sob atmosfera modificada de Bananas Prata, Pacovan e Nanicao tratadas póscolheita com 1-metilciclopropeno (1-MCP)**. 2002. 155f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba. 2002.
- 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. 131f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio ambiente) – Instituto de Botânica da secretaria de meio ambiente, 2006.
- PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, Citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 169-176, 1997.
- PRIZÃO, E.C.; GONÇALVES, L.M.; GUTIERRE, M.A.M.; MANGOLIN, C.A. & MACHADO, M.F.P.S. Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid duple-hybrid 'BLZ Pastoral innocence'. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 157-161, 2012.
- RAMOS, M.S.S. **A orquídea e sua reprodução pela semente**. Campinas: Saraiva, 1969.
- RODRIGUES, G. **Cultivo in vitro de duas espécies de Cattleya, com diferentes concentrações de auxina e citocininas**. 2009. 48f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- SILVA, P.A.K.X.; CALLEGARI, S.J; BODANESE, M.H.Z. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2000.
- SOARES, J.D.R.; ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ASSIS, A. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 772-777, mai/jun, 2009.
- SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; VILLA, F.; ARAÚJO, A.G. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, jul, 2011.
- THORPE, J.P., SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. **Zoologica Scripta**, Norway, v. 23, n. 1, p. 3-18, jul, 1984.

